

Transkriptionelle Regulation der humanen Proteinkinase DYRK1A und Eigenschaften von DYRK1B-Spleißvarianten

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Barbara Mänz

aus

Saarbrücken

Bonn 2006

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Herr Prof. Dr. rer. nat. Walter Becker

2. Referent: Herr Prof. Dr. med. Klaus Mohr

Tag der Promotion: 26.03.2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2002 bis September 2006 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Rheinisch-Westfälisch-Technischen Hochschule Aachen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Walter Becker angefertigt. Herr Prof. Dr. med. Klaus Mohr (Pharmakologie und Toxikologie, Pharmazeutisches Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) war Zweitbetreuer.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Proteinkinasen	1
1.2 Die DYRK-Familie	2
1.3 Die Proteinkinasen DYRK1A und DYRK1B	3
1.3.1 <i>DYRK1A</i> – ein Kandidatengen für die mentale Retardierung bei Down-Syndrom.....	3
1.3.2 Das DYRK1A-Protein	6
1.3.3 <i>DYRK1B</i> -Gen und DYRK1B-Protein	7
1.4 Ziele der Arbeit.....	9
 2. Material und Methoden.....	 10
2.1 Material	10
2.1.1 Chemikalien.....	10
2.1.2 Lösungen.....	13
2.2 Molekularbiologische Grundtechniken	20
2.2.1 Sterilisierung.....	20
2.2.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> DH5 α (Hanahan, 1983).....	20
2.2.3 Chemische Transformation kompetenter <i>E. coli</i> und Isolierung von Plasmid-DNA.....	21
2.2.4 Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion zur Analyse von DNA.....	22
2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten	22
2.2.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA	23
2.2.7 Isolierung genomischer DNA aus Säugetier-Zelllinien.....	23
2.2.8 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugetier-Zelllinien.....	24
2.2.9 Agarosegelelektrophorese zur RNA-Analyse	24
2.3 Klonierungen.....	25
2.3.1 Umklonierung von drei DYRK1B-Spleißvarianten	25
2.3.2 Klonierung von <i>DYRK1A</i> -Promotorfragmenten	27
2.4 Kultivierung von Säugetierzellen.....	35
2.4.1 Säugetier-Zelllinien.....	35
2.4.2 Medien und allgemeine Kulturbedingungen	36

2.4.3 Kryokonservierung.....	37
2.4.4 Subkultivierung.....	37
2.5 Transfektion von Säugetier-Zelllinien.....	38
2.5.1 Transiente Transfektion von Säugetierzellen mit dem „ <i>FuGENE 6</i> <i>Transfection Reagent</i> “ (Roche Diagnostics Corporation, Mannheim).....	38
2.5.2 Stabile Transfektion der Säugetier-Zelllinie NIH-3T3 durch transgene Retroviren.....	38
2.6 Isolierung von Proteinen aus Säugetier-Zelllinien.....	40
2.6.1 Kernextrakte.....	40
2.6.2 Denaturierende Lyse („SDS-Lyse“).....	41
2.6.3 Native Lyse.....	41
2.7 Immunpräzipitation.....	42
2.8 Kinase-Assay.....	42
2.9 DNA-Retardierungs-Assay (EMSA).....	44
2.10 Reporter-gen-Assay, Gesamtproteinbestimmung und Beta-Galaktosidase- Assay.....	47
2.10.1 Reporter-gen-Assay.....	47
2.10.2 Gesamtproteinbestimmung.....	48
2.10.3 Beta-Galaktosidase-Assay.....	49
2.11 <i>Northern blot</i> und <i>Arrays</i>	50
2.11.1 <i>Northern blot</i>	50
2.11.2 Radioaktive Markierung von cDNA-Sonden mit ³² P.....	50
2.11.3 Hybridisierung und Waschung von <i>Arrays</i> und <i>Northern blots</i>	51
2.11.4 Quantitative Auswertung von <i>Northern blot</i> -Hybridisierungen.....	53
2.12 RNA-Interferenz.....	54
2.13 <i>Western blot</i> und immunchemische Detektion von Proteinen.....	56
2.13.1 <i>Western blot</i>	56
2.13.2 Immunchemische Detektion mittels Peroxidase (POD)-vermittelter Chemilumineszenz.....	58
2.14 Quantifizierung der Lebensfähigkeit von Zellen.....	59
2.15 Datenbankrecherchen.....	60
2.16 CAGE- <i>Tag</i> -Analyse.....	61

3. Ergebnisse	62
3.1 Lokalisation der <i>DYRK1A</i> -Promotoren.....	62
3.1.1 Alternative Transkriptionsstarts des humanen <i>DYRK1A</i> -Gens.....	62
3.1.2 CAGE-Tag-Analyse der <i>DYRK1A</i> -Promotorregion.....	65
3.1.3 Kein Promotor <i>upstream</i> von Exon1G in SAOS-2- und COS-7-Zellen	67
3.1.4 Promotoraktivitäten der 5'-flankierenden Bereiche der Transkriptions- starts A und B des <i>DYRK1A</i> -Gens	67
3.2 Einfluss von Serum auf die Aktivitäten der beiden alternativen <i>DYRK1A</i> - Promotoren	70
3.3 Auswirkungen des DNA-Synthese-Inhibitors 5-Fluorouracil (5-FU) auf <i>DYRK1A</i> -mRNA und <i>DYRK1A</i> -Protein	72
3.3.1 Differentielle Genexpression von <i>DYRK1A</i> in humanen Tumoren („ <i>Cancer Profiling Array I</i> “).....	72
3.3.2 Gewebsspezifische Hochregulation der <i>DYRK1A</i> -mRNA durch 5-FU („ <i>Cancer Cell Line Profiling Array</i> “).....	74
3.3.3 Hochregulation der <i>DYRK1A</i> -mRNA durch 5-FU (<i>Northern blots</i>).....	77
3.3.4 Kein Einfluss von 5-FU auf die beiden <i>DYRK1A</i> -Promotoren	81
3.3.5 Kein Anstieg der <i>DYRK1A</i> -Proteinmenge durch 5-FU.....	82
3.4 <i>DYRK1A</i> - und <i>TP53</i> -Status humaner Tumorzelllinien.....	84
3.5 Auswirkungen der Zellzyklus-aktiven Substanzen Aphidicolin, Nocodazol und Lovastatin auf die <i>DYRK1A</i> -mRNA.....	87
3.6 <i>DYRK1A</i> – ein <i>Target</i> -Gen des Transkriptionsfaktors E2F1?	89
3.6.1 Hochregulation der <i>DYRK1A</i> -Expression durch exogenes E2F1	89
3.6.2 Kein Anstieg der <i>DYRK1A</i> -Proteinmenge durch exogenes E2F1	96
3.7 <i>DYRK1A</i> – ein mögliches <i>Target</i> -Gen des Transkriptionsfaktors CREB.....	97
3.8 Stabilität der <i>DYRK1A</i> -mRNA.....	103
3.9 Expression und Funktion von <i>DYRK1B</i> -Spleißvarianten.....	108
3.9.1 Spleißvarianten der Proteinkinase <i>DYRK1B</i> in adhärenen Zelllinien.....	108
3.9.2 Funktionelle Charakterisierung von <i>DYRK1B</i> -Spleißvarianten.....	109
3.9.3 Erzeugung von <i>DYRK1B</i> -p65, -p69 bzw. -p75 stabil überexprimieren- den NIH-3T3-Zellen	110
3.9.4 Erhöhte <i>DYRK1A</i> - und <i>DYRK1B</i> -Mengen bei Serumentzug	112

4. Diskussion	116
4.1 Promotoren des <i>DYRK1A</i> -Gens	116
4.2 <i>DYRK1A</i> -Expression im Zellzyklus	121
4.2.1 <i>DYRK1A</i> – ein Zielgen des Transkriptionsfaktors E2F1?	121
4.2.2 <i>DYRK1A</i> – ein Fluorouracil-responsives Gen mit variablem Expressionsmuster in humanen Tumorzellen bzw. Tumorzelllinien	123
4.2.3 <i>DYRK1A</i> – ein Zielgen des Transkriptionsfaktors CREB?	125
4.2.4 Erhöhte <i>DYRK1A</i> -Expression bei Entzug von Serum.....	127
4.3 Stabilität der <i>DYRK1A</i> -mRNA.....	128
4.4 Charakterisierung von DYRK1B-Spleißvarianten.....	129
4.4.1 Expressionsmuster von DYRK1B-p65, -p69 und -p75.....	129
4.4.2 Funktionelle Charakterisierung dieser drei DYRK1B-Spleißvarianten....	130
4.4.3 Regulation von DYRK1B in NIH-3T3-Zellen	132
 5. Zusammenfassung	 133
 6. Literatur	 135
 7. Anhang	 150
7.1 Verzeichnis der Abkürzungen	150
7.2 Verzeichnis der Abbildungen	154
7.3 Verzeichnis der Tabellen.....	157

Vorbemerkung: Die Namen humaner Gene werden groß und kursiv, die Namen von Nagetier-Genen werden klein und kursiv geschrieben.
Proteine werden groß und nicht kursiv geschrieben.

1. Einleitung

1.1 Proteinkinasen

Proteinkinasen katalysieren in Eukaryoten die reversible Phosphorylierung von Proteinen (Edelman *et al.*, 1987; Cohen, 1992). Das humane „Kinom“ umfasst ca. 500 Proteinkinasen, die essenzielle zelluläre Prozesse steuern, z. B. Genexpression, Zellteilung, Zelldifferenzierung und Apoptose (Manning *et al.*, 2002). Ungefähr 1,7% der humanen Gene kodieren Proteinkinasen, deren große Anzahl auf die Vielfalt ihrer regulatorischen Funktionen schließen lässt.

Die DYRK-Familie, deren Mitglieder DYRK1A und DYRK1B Gegenstand dieser Arbeit sind, bildet einen Teil der CMGC-Gruppe (Manning *et al.*, 2002), zu der z. B. auch die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), die MAP-Kinasen, die GSK3/CK2-Familie und die CLK-Familie gehören. Diese Kinasen regulieren beispielsweise den Zellzyklus oder Spleißvorgänge.

Hinsichtlich ihrer Substratspezifität unterscheidet man Serin-/Threoninkinasen, Tyrosinkinasen (Krebs & Beavo, 1979; Hanks & Quinn, 1991) sowie Proteinkinasen mit dualer Spezifität (Lindberg *et al.*, 1992). Letztere katalysieren die Übertragung der endständigen Phosphatgruppe des ATP sowohl auf alkoholische als auch auf phenolische Hydroxylgruppen.

Proteinkinasen werden aktiviert durch „*second messengers*“ (z. B. cAMP (Taylor *et al.*, 1990), Ca²⁺-Ionen (Azzi *et al.*, 1992)), Phosphorylierung durch andere Kinasen (z. B. Kinasen-Kinasen (z. B. MEK1/2) (Segar & Krebs, 1995)) oder Autophosphorylierung (z. B. DYRK1A (Becker & Joost, 1999), GSK3β (Cole *et al.*, 2004)). Die Inhibition von Proteinkinasen kann z. B. durch autoinhibitorische Sequenzabschnitte (z. B. Proteinkinase A (Soderling, 1990)) oder durch Phosphorylierung (z. B. GSK3β (Sutherland *et al.*, 1993)) geschehen.

Vor der pharmazeutischen Entwicklung spezifischer Proteinkinaseinhibitoren müssen zur Abschätzung der Hemmeffekte ihre Regulation(en) und Funktion(en) erforscht werden (Cohen, 2002). Beispielsweise hemmt der duale Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib die Rezeptoren EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) und HER2/neu und wird bei fortgeschrittenem und metastasiertem Mammakarzinom eingesetzt, bei dem diese Rezeptoren überexprimiert werden (Nelson & Dolder, 2006).

1.2 Die DYRK-Familie

In dieser Arbeit werden die Proteinkinasen DYRK1A und DYRK1B näher charakterisiert. Sie sind Mitglieder der evolutionär konservierten DYRK-Familie, die mit DYRK2, DYRK3 und DYRK4 noch drei weitere Vertreter in Säugetieren zählt (Becker *et al.*, 1998; Becker & Joost, 1999). MNB („minibrain“) (Tejedor *et al.*, 1995) und dDYRK2 (Lochhead *et al.*, 2003) in *Drosophila melanogaster* sowie Yak1p (*Saccharomyces cerevisiae*) (Garrett & Broach, 1989), Pom1p (*Schizosaccharomyces pombe*) (Bähler & Pringle, 1998) und YakA (*Dictyostelium discoideum*) (Souza *et al.*, 1998) in niederen Eukaryoten sind weitere Vertreter der DYRK-Familie. Den Namen DYRK erhielt diese Proteinkinasefamilie aufgrund der engen Verwandtschaft von DYRK1A mit Yak1p: „Dual-Specificity Yak1-Related Kinase“. Aufgrund neuer Erkenntnisse über die Autophosphorylierung dieser Kinasen steht DYRK mittlerweile für „Dual-Specificity Tyrosine (Y) Phosphorylation-Regulated Kinase“. Die duale Spezifität der Mitglieder der DYRK-Familie äußert sich in der Phosphorylierung von Serin- bzw. Threoninresten an ihren Substraten (Konsensussequenz RPx(S/T)P)¹ sowie in der Autophosphorylierung des zweiten Tyrosinrestes im Sequenzmotiv „YxY“ in der Aktivierungsschleife, zwischen den Subdomänen VII und VIII ihrer konservierten katalytischen Domäne (Kentrup *et al.*, 1996; Becker & Joost, 1999; Himpel *et al.*, 2001). Die strukturellen Gemeinsamkeiten der DYRK-Mitglieder beschränken sich auf die katalytische Domäne (Becker *et al.*, 1998) und die DH-Box (DYRK Homology-Box) mit der Konsensussequenz DDDNxDY (Becker & Joost, 1999) unmittelbar vor der katalytischen Domäne. Voraussetzungen für die volle katalytische Aktivität sind die Autophosphorylierung an einem Tyrosinrest in der Aktivierungsschleife, die zumindest in MNB und dDYRK2 intramolekular bereits während der Translation abläuft (Lochhead *et al.*, 2005), und der in der Nähe der Autophosphorylierungsstelle befindliche Glutaminrest (Wiechmann *et al.*, 2003).

Das Expressionsmuster der Mitglieder der eukaryotischen DYRK-Familie ist heterogen. Während DYRK1A ubiquitär exprimiert wird, wurden DYRK1B, DYRK2, DYRK3 und DYRK4 vornehmlich in Skelettmuskel und Hoden nachgewiesen (Becker *et al.*, 1998; Leder *et al.*, 1999). DYRK3 wird außerdem stark in erythroiden Progenitorzellen exprimiert (Geiger *et al.*, 2001). Auch in ihrer subzellulären Lokalisation

¹ x: beliebige Aminosäure

unterscheiden sich die Vertreter der DYRK-Familie: während DYRK1A und DYRK1B aufgrund mindestens eines Kernlokalisierungssignales hauptsächlich im Zellkern nachgewiesen wurden, sind die übrigen Mitglieder der DYRK-Familie im Zytoplasma lokalisiert (Becker *et al.*, 1998; Leder *et al.*, 1999; Álvarez *et al.*, 2003). Aufgrund ihrer heterogenen Expressionsmuster und Substratspezifitäten sowie ihrer evolutionären Konservierung vermutet man unterschiedliche, aber grundlegende zelluläre Funktionen der DYRK-Proteinkinasen (Becker *et al.*, 1998). In niederen Eukaryoten (z. B. in der Bäckerhefe) (Garrett *et al.*, 1991) und auch in höheren Eukaryoten (z. B. im menschlichen Organismus) sind sie an der Regulation von Zellwachstum und -entwicklung beteiligt (Becker & Joost, 1999; Hämmerle *et al.*, 2003b).

1.3 Die Proteinkinasen DYRK1A und DYRK1B

1.3.1 *DYRK1A* – ein Kandidatengen für die mentale Retardierung bei Down-Syndrom

Die erste DYRK in Säugetieren, die kloniert und charakterisiert wurde, ist die ubiquitär exprimierte Proteinkinase DYRK1A (Kentrup *et al.*, 1996). Das *DYRK1A*-Gen umfasst ca. 150 kb genomischer DNA. Das *full-length-DYRK1A*-Transkript ist 5,2 kb lang und umfasst 17 Exons. Zwei alternative Transkriptionsstarts in den nicht-kodierenden Exons 1 bzw. 2 vermitteln eine differenzielle Genexpression: das in Exon 2 beginnende Transkript wurde ubiquitär, das in Exon 1 startende Transkript jedoch nur im Herz- und im Skelettmuskel nachgewiesen (Guimerà *et al.*, 1999).

Eine differenzielle *DYRK1A*-Expression wird *in vitro* an zwei Beispielen deutlich: in Metastasen humaner Melanomzelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungsverhalten (de Wit *et al.*, 2002) und in metastatischen Neoplasien des endokrinen Pankreas (Hansel *et al.*, 2004) wird die *DYRK1A*-Expression im Vergleich zu den entsprechenden Melanomzellen bzw. nicht-metastatischen Neoplasien deutlich herunterreguliert.

Über die *DYRK1A*-Promotorregion und die Regulation der *DYRK1A*-Expression ist jedoch noch nichts bekannt.

Das humane *DYRK1A*-Gen wurde in der 2 Mb großen „Down Syndrome Critical Region“ (DSCR) auf Chromosom 21 im Bereich der Bande 21q22.2 lokalisiert (Guimerà *et al.*, 1996; Shindoh *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1996; Ohira *et al.*, 1997; Chen & Antonarakis, 1997; Smith *et al.*, 1997). Die vollständige Sequenzierung des humanen Chromosoms 21 ergab, dass *DYRK1A* auf der Bande 21q22.13 liegt (Hattori *et al.*, 2000). Das Down-Syndrom wurde erstmals 1866 von dem britischen Arzt und Apotheker Dr. John Langdon Down beschrieben und tritt mit einer Häufigkeit von 1 : 700 bis 1 : 1.000 auf. Es wird entweder durch vollständige oder – in sehr seltenen Fällen – partielle Trisomie 21 (drei Kopien des chromosomalen Segmentes 21q22.2) verursacht und äußert sich in einem komplexen individuellen Phänotyp, z. B. in geistiger Retardierung, Herzkrankheit, Anomalien des Gastrointestinaltraktes, einem erhöhten Leukämierisiko, Defekten des Immun- und Hormonsystems, früher Alzheimer-Demenz und einer besonderen Physiognomie (Hassold & Jacobs, 1984; Roper & Reeves, 2006). Durch die Korrelation von Phänotyp und Genotyp von Patienten mit partiellen Trisomien wurde die ca. 20 Gene umfassende DSCR definiert, die in dreifacher Kopienzahl für viele charakteristische Merkmale des Down-Syndroms, beispielsweise geistige Retardierung und Hypotonie, verantwortlich ist (Delabar *et al.*, 1993; McCormick *et al.*, 1989; Rahmani *et al.*, 1989).

Bei transgenen Mäusen, die ein 180 kb langes Fragment aus der humanen DSCR, das nur das humane *DYRK1A*-Gen beinhaltet, zusätzlich exprimieren, wurden deutliche Lern- und Gedächtnisdefizite sowie Hyperaktivität während der Entwicklung festgestellt, die an manche Störungen bei Down-Syndrom erinnern (Smith *et al.*, 1997; Branchi *et al.*, 2004). Da in diesem Tiermodell auch eine spezifische Gewichtszunahme des Gehirns und morphologische Veränderungen an Neuronen auftraten, scheint *DYRK1A* eine entscheidende Rolle im Gehirn zu spielen (Branchi *et al.*, 2004). Einen weiteren Hinweis darauf, dass die Überexpression von *DYRK1A* zumindest mit geistiger Retardierung korreliert, lieferte der Phänotyp transgener Mäuse, die murines *Dyrk1a* überexprimieren: spezifische neuromotorische Entwicklungsdefizite, Hyperaktivität und Lerndefizite, einhergehend mit Veränderungen in Cerebellum und Cortex (Altafaj *et al.*, 2001; Martínez de Lagrán *et al.*, 2004).

Da heterozygote *Knockout*-Mäuse (*Dyrk1a*^{+/-}) eine verringerte neonatale Lebensfähigkeit, Hypoaktivität und im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine signifikant kleinere Größe des Körpers und bestimmter Gehirnregionen aufweisen, und da der homozygote *Knockout* (*Dyrk1a*^{-/-}) zu Wachstumsverzögerungen, Minderdurchblutung und

schließlich zu embryonaler Letalität (zwischen dem 10,5. und dem 13,5. Tag der Schwangerschaft) der Mäuse führt, wird der phylogenetisch konservierten Proteinkinase DYRK1A eine wesentliche Bedeutung für Wachstums- und Entwicklungsprozesse zugeschrieben (Fotaki *et al.*, 2002).

In den heterozygoten (*Dyrk1a*^{+/-}) *Knockout*-Mäusen erwiesen sich die Pyramidalzellen des Cortex als beträchtlich kleiner und weniger verzweigt als in den Kontrolltieren, was darauf hindeutet, dass DYRK1A die Fähigkeit der Informationsverarbeitung in Pyramidalzellen des Cortex, d. h. das Lernverhalten, beeinflusst (Benavides-Piccione *et al.*, 2005). Der Phänotyp dieser Mäuse ähnelt dem von Patienten mit partieller Monosomie 21, deren Mikrocephalie und intrauterine Wachstumsstörung auf die Deletion eines 1,2 Mb großen 21q22.2-Segments zurückzuführen sind (Fotaki *et al.*, 2002; Matsumoto *et al.*, 1997). Die Relevanz von DYRK1A bei der Entwicklung und Funktion des Zentralen Nervensystems wird auch an einer deutlichen Volumenreduktion bestimmter Gehirnareale infolge fehlerhafter Neuroblastenproliferation während der postembryonalen Entwicklung von *Drosophila melanogaster* mit dem unterexprimierten DYRK1A-Ortholog MNB deutlich (Tejedor *et al.*, 1995).

All diese Erkenntnisse und die Tatsache, dass *DYRK1A* im Gehirn von Föten mit Down-Syndrom 1,5-fach überexprimiert wird, sprechen für einen „Gendosis“-Effekt von *DYRK1A* bzw. für *DYRK1A* als Kandidatengen für die mentale Retardierung bei Down-Syndrom (Guimerà *et al.*, 1999; Song *et al.*, 1996; Becker & Joost, 1999).

So entstand die Idee, DYRK1A-Hemmstoffe zu entwickeln. Roscovitin (IC₅₀ 3,1 µM), Purvalanol A (IC₅₀ 0,3 µM) und Epigallocatechin-3-gallat (IC₅₀ 0,33 µM) stellen potente, aber unselektive und reversible DYRK1A-Inhibitoren dar (Bain *et al.*, 2003). Zwei weitere Hemmstoffe der Proteinkinase DYRK1A wurden durch eine Kombination von *in silico*-Screening, *in vitro*-Assay und zellbasierten Screenings identifiziert. Eine weitere Optimierung dieser Substanzen könnte zu einem neuen Arzneistoff gegen Lern- und Gedächtnisdefizite von Menschen mit Down-Syndrom führen (Kim *et al.*, 2006).

1.3.2 Das DYRK1A-Protein

Zwei Kernlokalisierungssignale im N-Terminus bzw. in der *Linker*-Region zwischen den Subdomänen X und XI dirigieren DYRK1A in den Zellkern, wo sich die Kinase aufgrund eines Sequenzmotivs aus 13 Histidinresten im C-Terminus und eines weiteren Motivs innerhalb der ersten 104 Aminosäuren in „*nuclear speckles*“ anreichert, d. h. mit der Kernmatrix assoziiert. Anhand der Fusionskonstrukte EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*)-DYRK1A und EGFP-DYRK1A₁₋₁₇₆ wurde die nukleäre Lokalisation von DYRK1A (Kentrup *et al.*, 1996) beispielsweise in COS-7-Zellen bestätigt (Becker *et al.*, 1998; Álvarez *et al.*, 2003). Die im C-Terminus enthaltene PEST-Region könnte den schnellen Abbau des Proteins in der Zelle vermitteln (Rogers *et al.*, 1986) (Abb. 1.1).

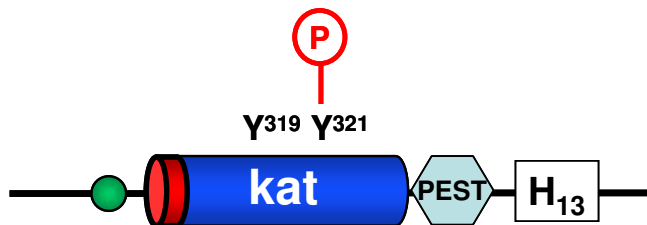


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Proteinkinase DYRK1A in Säugetieren

Grün: Kernlokalisierungssignal; rot: DH-Box; kat: katalytische Domäne; Y³¹⁹, Y³²¹: konservierte Tyrosinreste in der Aktivierungsschleife; P: Phosphatrest; PEST: PEST-Region; H₁₃: Motiv aus 13 repetitiven Histidinresten.

Die durch alternatives Spleißen entstehenden DYRK1A-Isoformen bestehen aus 754 bzw. 763 Aminosäuren und weisen Proteinmassen von ± 90 kDa auf (Kentrup *et al.*, 1996; Shindoh *et al.*, 1996). Da die Proteinkinase *DYRK1A* ab dem Zeitpunkt ihrer Biosynthese autophosphoryliert vorliegt, d. h. möglicherweise konstitutiv aktiv ist, könnte das Ausmaß ihrer Aktivität über ihre Transkription, ihre Inhibition oder ihren Abbau reguliert werden (Lochhead *et al.*, 2005). Sie wird beispielsweise nur in bestimmten Phasen der Entwicklung des Zentralen Nervensystems des Hühnerküken exprimiert (Hämmerle *et al.*, 2002; Hämmerle *et al.*, 2003a). Möglicherweise reguliert die *in vitro*- und *in vivo*-Interaktion von DYRK1A mit dem Protein 14-3-3 die DYRK1A-Kinaseaktivität (Kim *et al.*, 2004).

Die entscheidende Bedeutung von DYRK1A für Zellwachstum bzw. -differenzierung äußert sich beispielsweise in der DYRK1A-vermittelten Phosphorylierung der Trans-

kriptionsfaktoren CREB und GLI1 (*Glioma-Associated Oncoprotein*) (Galceran *et al.*, 2003). DYRK1A und ARIP4 (*Androgen Receptor-Interacting Protein 4*) interagieren ebenfalls miteinander und aktivieren synergistisch die Androgenrezeptor- und Glukokortikoidrezeptor-abhängige Transkription, was für eine Beteiligung von DYRK1A an Hippocampus-abhängigem räumlichem Lernen und Gedächtnis spricht (Sitz *et al.*, 2004). Desweiteren stimuliert DYRK1A die FKHR (*Forkhead in Rhabdomyosarcoma*)-abhängige Expression der Glukose-6-Phosphatase (von Groote-Bidlingmaier *et al.*, 2003). Der Proteinsynthese-Initiationsfaktor eIF2B ϵ , das mit Mikrotubuli assoziierte Protein Tau und das für Endozytose bzw. synaptische Plastizität bedeutsame Dynamin1 sind *in vitro*-Substrate von DYRK1A (Woods *et al.*, 2001a). DYRK1A hat auch eine Funktion als „*priming kinase*“ für GSK3: so wird z. B. der im Zellkern aktive Transkriptionsfaktor NFAT (*Nuclear Factor of Activated T Cells*) erst durch DYRK1A und anschließend durch GSK3 phosphoryliert, woraufhin NFAT aus dem Kern exportiert wird und nicht mehr die Genexpression von Zytokinen oder neuronalen Wachstumsfaktoren aktivieren kann. Die 1,5-fache *DYRK1A*-Gendosis bei Down-Syndrom könnte daher z. B. für Immundefekte oder neuronale Wachstumsstörungen infolge Dysregulation der NFAT-Signaltransduktion verantwortlich sein (Arron *et al.*, 2006).

Die Proteinkinase DYRK1A ist möglicherweise auch an der Regulation von Spleißvorgängen beteiligt, da sie Cyclin L2 (de Graaf *et al.*, 2004) sowie den Spleißfaktor SF3b1 (de Graaf *et al.*, 2006) phosphorylieren kann.

1.3.3 *DYRK1B*-Gen und *DYRK1B*-Protein

Das auf dem humanen Chromosom 19 (19q12 - 13.11) lokalisierte *DYRK1B*-Gen wird in hohem Maße im Hoden und im Skelettmuskel, in anderen Geweben dagegen nur relativ schwach transkribiert (Leder *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000).

Die Proteinkinase DYRK1B in Säugetieren weist in der katalytischen Domäne eine Ähnlichkeit von 85% zu DYRK1A auf (Leder *et al.*, 1999). Beispielsweise besitzt auch sie ein N-terminales Kernlokalisationsignal, das für ihre vornehmlich nukleäre Lokalisation verantwortlich ist (Becker *et al.*, 1998) (Abb. 1.2).

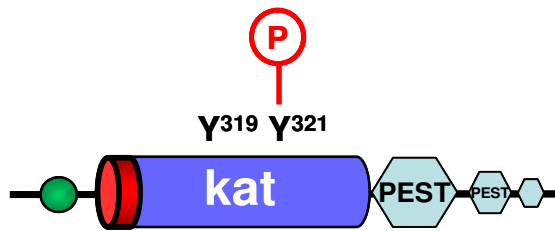


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Proteinkinase DYRK1B in Säugetieren

Grün: Kernlokalisations-Signal; rot: DH-Box; kat: katalytische Domäne; Y³¹⁹, Y³²¹: konservierte Tyrosinreste in der Aktivierungsschleife; P: Phosphatrest; PEST bzw. hellblau: PEST-Region.

DYRK1B-p65, DYRK1B-p69 und DYRK1B-p75 repräsentieren drei Spleißvarianten von DYRK1B mit unterschiedlichen Expressionsmustern und Enzymaktivitäten in höheren Eukaryoten (Leder *et al.*, 2003). Trotz hoher Sequenzähnlichkeit, subzellulärer Verteilung und teilweise identischer Gewebsverteilung haben die Kinasen DYRK1A und DYRK1B offenbar unterschiedliche Funktionen, denn die homozygote, fertile *Dyrk1b*^{-/-}-Knockout-Maus weist im Gegensatz zur homozygoten *Dyrk1a*^{-/-}-Knockout-Maus keinen auffälligen Phänotyp auf (Leder, 2001). Da DYRK1B die *Myogenin*-Expression auf indirekte Weise hochreguliert, wird die Kinase mit der Differenzierung des nicht-embryonalen Skelettmuskels assoziiert (Deng *et al.*, 2005). Die nur während der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus von Myoblasten stark exprimierte DYRK1B stabilisiert den CDK-Inhibitor p27^{kip1} durch Phosphorylierung (Deng *et al.*, 2004) und destabilisiert Cyclin D1 durch Phosphorylierung (Zou *et al.*, 2004), wodurch Wachstumsstopp bzw. die Differenzierungsphase aufrecht erhalten werden. In C2C12-Myoblasten gelangt der CDK-Inhibitor p21^{Cip1} nach Phosphorylierung durch DYRK1B ins Zytoplasma, wo er proapoptotische Moleküle hemmt (Mercer *et al.*, 2005).

Nach Aktivierung durch Rac1-MKK3 vermittelt DYRK1B in Tumorzelllinien ebenfalls eine antiapoptotische Wirkung (Jin *et al.*, 2005). Zahlreiche Tumorzelllinien, z. B. Kolonkarzinomzellen (Lee *et al.*, 2000) oder duktales Adenokarzinomzellen des Pankreas (Deng *et al.*, 2006), exprimieren verstärkt die ihnen offenbar als Überlebensfaktor dienende DYRK1B.

1.4 Ziele der Arbeit

Regulation(en) und Funktion(en) der bereits vor zehn Jahren von unserer Arbeitsgruppe erstmals beschriebenen DYRK-Proteinkinasen in Eukaryoten (Kentrup *et al.*, 1996) sind noch nicht hinreichend bekannt.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Promotorregion des humanen *DYRK1A*-Gens, der Regulation der *DYRK1A*-Expression sowie der drei humanen DYRK1B-Spleißvarianten DYRK1B-p65, DYRK1B-p69 und DYRK1B-p75.

Da die Proteinkinase DYRK1A ab dem Zeitpunkt ihrer Biosynthese in der Aktivierungsschleife autophosphoryliert und daher möglicherweise konstitutiv aktiv ist, könnten z. B. ihre transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulation, d. h. mRNA-Synthese und mRNA-Abbau, ihre Funktion entscheidend beeinflussen.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die transkriptionelle Regulation von DYRK1A. Nach der Bestimmung der Promotoranzahl und -aktivität(en) in unterschiedlichen Säugetier-Zelllinien sollte die *DYRK1A*-Expression in verschiedenen Tumorzelllinien sowie in normalem Gewebe und Tumorgewebe verglichen werden. Desweiteren sollte untersucht werden, ob Faktoren, die in den Zellzyklus eingreifen, die *DYRK1A*-Expression in Tumorzelllinien beeinflussen. Vor dem Hintergrund, dass DYRK1A eine wichtige Rolle bei Zellproliferation bzw. Zelldifferenzierung spielt, stellt sich die Frage, ob die Transkriptionsfaktoren E2F1 und CREB, aber auch der Entzug von Wachstumsfaktoren die *DYRK1A*-Expression regulieren. Von der Untersuchung der *DYRK1A*-mRNA-Stabilität wurden Hinweise darauf erwartet, ob die DYRK1A-Menge und damit ihre Funktion schnell in der Zelle reguliert werden.

Außerdem sollten Expression und Funktion der DYRK1B-Spleißvarianten p65, p69 und p75 in Säugetier-Zelllinien näher untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid/Bis-Acrylamid 37,5 : 1 (2,6% C, 30% w/v), „*Electrophoresis Purity Reagent*“ (Bio-Rad)

Acrylamid/Bis-Acrylamid 19 : 1 (40% w/v) (Amresco, Bio-Rad)

Acryl Glide Glass Plate Coating (Amresco)

Agar „*Select-Agar*“ (Sigma)

Agarose SeaKem[®] LE (*For gel electrophoresis*) (BMA)

Aktinomycin D (Sigma)

Ammoniumpersulfat (APS) „*ultra pure*“ (Gibco BRL)

Ampicillin (Roche)

Aphidicolin (Calbiochem)

Aprotinin (Sigma)

Aqua bidest.

Biotinylated Protein Ladder Detection Pack (Cell Signaling Technology™)

Borsäure, zur Analyse (Merck)

Bovines Serumalbumin (BSA), „*acetylated*“, [10 mg/ml] (Promega)

Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V (Calbiochem)

Bromphenolblau (Merck)

Calciumchlorid-Dihydrat, zur Analyse (Merck)

p-Cumarinsäure (4-Hydroxy-Zimtsäure) (Sigma)

Diethylpyrocarbonat (DEPC) (Sigma)

Dimethylformamid (DMF) (Fluka)

Dimethylsulfoxid (DMSO), zur Analyse (Merck)

di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, zur Analyse (Merck)

D,L-Dithiothreitol (DTT) (MP Biomedicals)

DNA, „*MB grade*“, aus Fischsperma, [10 mg/ml] (Roche Diagnostics)

dNTP-Set, 100 mM „*Solutions*“ (Amersham Pharmacia Biotech)

Doxycyclinhydrochlorid (Sigma)

Essigsäure 96%, zur Analyse (Merck)

Ethanol absolut, zur Analyse (Sigma)
 Ethidiumbromid, 100 mg „*Tablets*” (ICN Biomedicals)
 Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Dinatriumsalz, Dihydrat (Sigma)
 Ethylenglykol-bis (β -Aminoethylether)-N, N, N', N'-Tetraessigsäure (EGTA) (Sigma)
 Ficoll[®] 400 (Sigma)
 5-Fluorouracil (5-FU), min. 99% (TLC) (Sigma)
 Formalin (Formaldehyd) „*Molecular Biology Grade*” (Calbiochem)
 Formamid, „*ACS-Reagent*” (Sigma)
 Forskolin, aus *Coleus forskohlii* (Calbiochem)
 FuGENE[®]6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics)
 GeneRuler[™] 100bp Ladder Plus (MBI Fermentas)
 GeneRuler[™] 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas)
 D-(+)-Glucose, wasserfrei, für biochemische Zwecke (Merck)
 Glycerin, etwa 87%, zur Analyse (Merck)
 Glycin-Puffersubstanz für die Elektrophorese (Merck)
 Hefeextrakt, „*Yeast extract*” (Sigma)
 HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]), Minimum 99,5%
 (Sigma)
 Hexanukleotid-Primer („*pd (N)₆ Random Hexamer*”) (Amersham Pharmacia Biotech)
 IGEPAL CA-630 (entspricht NP-40, Nonidet P-40) (ICN Biomedicals)
 Isopropanol, zur Analyse (Merck)
 Kaliumacetat, reinst (Merck)
 Kaliumchlorid, zur Analyse (Merck)
 Kalium-Dihydrogenphosphat, zur Analyse (Merck)
 Kaliumhydroxid, Plätzchen, zur Analyse (Merck)
 Kanamycin (Sigma)
 Leupeptin (Serva)
 LiChrosolv[®] Wasser für die Chromatographie (Merck)
 6x Loading Dye Solution (MBI Fermentas)
 Lovastatin (entspricht Mevinolin), aus *Aspergillus* sp., min. 98% (HPLC) (Sigma)
 Luminol (5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-Phthalazindion), Minimum 97% (HPLC) (Sigma)
 Lysozym (Roche Diagnostics)
 Magermilchpulver (AppliChem)
 Magnesiumacetat, zur Analyse (Merck)

Magnesiumchlorid-Hexahydrat, zur Analyse (Merck)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat, zur Analyse (Merck)
Manganchlorid-Dihydrat (Merck)
MassRuler™ DNA Ladder, „Mix, ready-to-use“ (MBI Fermentas)
Methanol, zur Synthese, zur Analyse (Apotheke des Universitätsklinikums Aachen)
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), min. 99,5% (Sigma, AppliChem)
Natriumacetat-Trihydrat, reinst, Lebensmittelqualität (Merck)
Natriumazid (Merck)
Natriumchlorid, zur Analyse (Merck)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, zur Analyse (Merck)
Natriumdodecylsulfat (SDS) (ICN Biomedicals)
Natriumfluorid, zur Analyse (Merck)
Natriumhydroxid, Plätzchen, zur Analyse (Merck)
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4), Minimum 90% (Sigma)
Natriumpyrophosphat-Decahydrat (Sigma)
Natriumpyruvat, 100 mM (Sigma)
Neomycin „*Geneticin G-418 Sulphate*“ (Gibco BRL)
Nocodazol, min. 99% (TLC) (Sigma)
NP-40 (s. IGEPAL CA-630)
Orange-G, Natriumsalz (Sigma)
Pepstatin A (Sigma)
Pepton, „*Select-Peptide 140*“ (Gibco BRL, ICN)
Roti®-Phenol/Chloroform für die DNA/RNA-Isolierung (Carl Roth)
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF), > 99% (Sigma)
ortho-Phosphorsäure 85%, zur Analyse (Merck)
Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure] (PIPES), $\geq 99\%$ (Sigma)
Polybrene™ (Hexadimethrinbromid), min. 90% (*titration*) (Sigma)
PolydIdC (Amersham Pharmacia Biotech)
Polyvinylpyrrolidon (PVP) Av. Mol. Wt 360.000 (Sigma)
Ponceau S, Natriumsalz (Sigma)
ProteinA-Sepharose® (Sigma)
Proteinstandard SDS6H (Sigma)
Radioaktive Substanzen: $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ ($[10\text{ }\mu\text{Ci}/\mu\text{l}]$, 10 MBq, spezifische Aktivität: 3.000 Ci/mmol) (Hartmann Analytics)

*Ready Protein*TM *Liquid Scintillation Cocktail* (Beckman Instruments)
RNase A (Roche Diagnostics)
Roentoroll 25, „*Part 1*“, „*Part 2*“ (Entwickler für Röntgenfilme) (Tetenal)
Salzsäure, rauchend, 37%, zur Analyse (Merck)
SDS (entspricht Natriumdodecylsulfat) (ICN Biomedicals)
Superfix 25, „*Part 1*“, „*Part 2*“ (Fixierer für Röntgenfilme) (Tetenal)
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) (Bio-Rad)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, kristallin, reinst (Merck)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris(-Base)) (ICN Biomedicals)
Trypton (ICN Biomedicals)
Tween[®] 20 *R NF* (Polyoxyethylensorbitan) (MP Biomedicals)
Wasserstoffperoxid, 30%ige [v/v] Lösung in Wasser (Sigma)
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktosid) (ICN)

2.1.2 Lösungen

1%-Agarosegel (klein, für *Northern blot*):

0,8 g Agarose, 70 ml DEPC-Wasser, aufkochen, auf ca. 60°C durch Rühren herunterkühlen, 8 ml 10x MOPS (pH 7,2), 2,4 ml Formaldehyd

APS-Lösung:

0,5 g Ammoniumpersulfat, 1 ml A. bidest.

Blocking-Lösung:

3% (w/v) BSA in 1x TBST

BPB/Glycerin:

0,1% (w/v) Bromphenolblau, 50% (v/v) Glycerin, DEPC-behandeltes Wasser

Bromphenolblau-Lösung:

2% (w/v) Bromphenolblau, 4% (w/v) SDS, A. bidest.

BSA-Stammlösungen (Standards für Gesamtproteinbestimmung):

2 mg/ml BSA-Lösung (*Kit*); 1 mg bzw. 0,5 mg BSA (*Kit*)/ml A. bidest.

Cumarinsäure-Stammlösung:

90 mM p-Cumarinsäure (= p-Hydroxyzimtsäure) in DMSO

100x Denhardt's Lösung:

2% (w/v) BSA, 2% (w/v) Ficoll® 400, 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon, A. bidest.

DEPC-behandeltes Wasser:

0,1% DEPC [v/v], in A. bidest, 2 - 3 h schütteln, dann autoklavieren

ECL-Substratkomponente I:

1 ml Tris [1 M] (pH 8,5), 12 µl H₂O₂ [30% v/v], ad 10 ml A. bidest.

ECL-Substratkomponente II:

1 ml Tris [1 M] (pH 8,5), 100 µl Luminol-Stammlösung [250 mM], 44 µl p-Cumarinsäure-Stammlösung [90 mM], ad 10 ml A. bidest.

EDTA [0,5 M] (pH 8,0):

18,61 g EDTA (Dinatriumsalz, Dihydrat) mit ca. 60 ml A. bidest. mischen, mit Hilfe von NaOH-Plättchen lösen, pH 8,0 mit HCl konz. einstellen, ad 100 ml A. bidest.

1x Elektrodenpuffer (für *Western blot*):

25 mM Tris, 250 mM Glycin für die Elektrophorese, 0,1% SDS, A. bidest.
(automatisch pH 8,4)

EMSA-Cocktail (Angaben für 1 Probe):

4 µl 5x GSB, 0,1 µl DTT [1 M in A. bidest.], 1 µl PolydIdC-Stammlösung [1 µg/µl in TE, pH 8,0], 2 µl BSA „acetylated“ [10 mg/ml], 2,33 µl A. bidest., 0,2 µl PMSF-Lösung [200 mM in Ethanol]

Ethidiumbromid-Stammlösung:

10 mg Ethidiumbromid, 1 ml A. bidest.

5x GLB (Orange G-Gel Loading Buffer):

30% (v/v) Glycerin, 0,25% Orange G, 1x TAE, ad 1 ml A. bidest.

5x GSB (Gel Shift Buffer):

50 mM HEPES, 5 mM EDTA, 25 mM MgCl₂, 50% (v/v) Glycerin, A. bidest. (pH 7,8)

2x HBS:

275 mM NaCl, 1,4 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 10 mM KCl, 12 mM Glucose, 40 mM HEPES (pH 7,4), A. bidest. (pH 7,00 +/- 0,05), sterilfiltrieren

2x Hochsalz-Puffer:

840 mM NaCl, 40 mM HEPES (pH7,9), 2 mM EDTA, 2 mM EGTA (pH 8,0), 20% (v/v) Glycerol, A. bidest.

Hochsalz-Puffer (mit Zusätzen):

1x Hochsalz-Puffer, 20 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinin (in PBS), 1 µg/ml Leupeptin (in PBS), 1 µg/ml Pepstatin (in PBS), A. bidest.

2x Hypotonischer Puffer:

40 mM HEPES (pH 7,9), 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, A. bidest.

Hypotonischer Puffer (mit Zusätzen):

1x Hypotonischer Puffer, 20 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinin (in PBS), 1 µg/ml Leupeptin (in PBS), 1 µg/ml Pepstatin (in PBS), A. bidest.

Hypotonischer Puffer (mit Zusätzen) + NP-40:

0,2% (v/v) NP-40, Hypotonischer Puffer mit Zusätzen

Inkubationslösung für sekundären Antikörper (Western blot):

5% (w/v) Magermilchpulver in 1x TBST

2x Kinasepuffer/DTT für Substratmix:

100 mM HEPES (pH 7,4), 20 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 20 mM $\text{MnCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 2,0 mM DTT, A. bidest.

LB-Agar mit Ampicillin (LB_{Amp}):

15 g Agar, 1 l LB-Medium, autoklavieren, 100 mg Ampicillin

LB-Medium:

10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l A. bidest.

2x LSB (*Lämmli-Sample Buffer*):

20% (v/v) Glycerin, 8% (w/v) SDS, 10 mM EDTA (pH 8,0), 250 mM Tris (pH 6,8), 5 ml (0,1%) Bromphenolblaulösung, ad 100 ml A. bidest.

2x LSB/DTT:

60 mg DTT/ml 2x LSB

2x LSB ohne SDS:

26% Glycerin, 13 mM EDTA, 325 mM Tris (pH 6,8), 6,5 ml (0,13%) Bromphenolblaulösung, ad 100 ml A. bidest.

2x LSB ohne SDS/mit DTT:

60 mg DTT/ml 2x LSB ohne SDS

Luminol-Stammlösung:

250 mM Luminol in DMSO

Lysepuffer für denaturierende Lyse:

20 mM Tris (pH 7,4), 1% (w/v) SDS, ad 100 ml A. bidest.

Lysepuffer für native Lyse:

50 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 25 mM NaF, 2 mM EDTA, 30 mM Natrium-pyrophosphat, 1% NP-40, 1 mM PMSF, 1 mM Na_3VO_4 , 1 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin A (in PBS), 2 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin (in PBS), 1 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin (in PBS), A. bidest.

10x MOPS (pH 7,2):

400 mM MOPS, 27 mM Natriumacetat-Trihydrat, 10 mM EDTA, A. bidest. (pH 7,2)

Natriumorthovanadat-Lösung [100 mM]:

184 mg Na_3VO_4 mit 8 ml A. bidest. mischen, pH 10,0 mit NaOH einstellen (Gelbfärbung), aufkochen (bis zur Transparenz), erneut pH 10,0 mit NaOH einstellen, ad 10 ml A. bidest.

Northern blot-(Prä-)Hybridisierungspuffer:

50% (v/v) Formamid, 5x SSPE pH 7,4, 5x Denhardt's Lösung, 0,5% SDS (w/v), 0,1 mg/ml (0,01% (w/v)) DNA („MB grade“) aus Fischsperma, A. bidest.

Oberer Gelpuffer:

0,5 M Tris, 0,4% SDS, A. bidest. (pH 6,8)

10x OLB für dCTP:

500 mM Tris (pH 6,9), 100 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 1 mM DTT, 0,6 mM dATP, 0,6 mM dGTP, 0,6 mM dTTP, A. bidest.

4,5% PAA/Glycerin-Gel für EMSA:

6,75 ml Acrylamid/Bis-Acrylamid-Mischung [40%, 19 : 1], 1,50 ml 10x TBE (pH 8,0), 49,25 ml A. bidest., 2 ml Glycerin [87% (v/v)], 40 μl TEMED, 400 μl APS [10% (w/v)]

PBS (pH 7,4):

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 1,8 mM KH_2PO_4 , A. bidest.

PBS + V:

1 mM Na_3VO_4 , PBS (pH 7,4)

PBS + V + F:

1 mM Na_3VO_4 , 5 mM NaF, PBS (pH 7,4)

PMSF-Stammlösung [100 mM]:

17,5 mg PMSF/ml Ethanol absolut

Ponceau S-Färbelösung:

0,25 g Ponceau S in 40 ml Methanol teilweise lösen, 15 ml Essigsäure 96%,
ad 100 ml A. bidest., filtrieren

RNA-Probenpuffer (Angaben für 1 Probe):

39 µl DEPC-behandeltes Wasser, 32 µl 10x MOPS, 200 µl Formamid, 56 µl Form-
aldehyd, 80 µl BPB/Glycerin, 5 µl Ethidiumbromid-Stammlösung [10 µg/µl]

Sammelgel (für SDS-PAGE):

520 µl Oberer Gelpuffer, 260 µl Acrylamid/Bis-Acrylamid (30%, 37,5 : 1), 1,22 ml A.
bidest., 2 µl TEMED, 4 µl APS-Lösung

10% SDS (w/v):

10 g SDS, 100 ml A. bidest.

SOC-Medium:

20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 0,19 g KCl, A. bidest ad 1 l, autoklavieren,
dann Zugabe von 10 ml MgCl₂ [1 M] und 10 ml Glucose [20%], sterilfiltrieren

20x SSC (pH 7,0):

3 M NaCl, 300 mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, A. bidest. (pH 7,0)

20x SSPE (pH 7,4):

3 M NaCl, 200 mM mM NaH₂PO₄ x H₂O, 20 mM EDTA, A. bidest. (pH 7,4 mit NaOH)

Substratmix (für Kinase-Assay):

5 µl 2x Kinasepuffer/DTT, 0,4 µl ATP [500 µM], 2 µl DYRKtide [2 mM], 1 µCi [γ-³²P]-
ATP, ad 15 µl A. bidest. (20 µl Reaktionsvolumen inklusive *Pellet*)

50x TAE (pH 8,0):

2 M Tris, 5,5% (v/v) Essigsäure 96 %, 50 mM EDTA, A. bidest. (pH 8,0)

TB (pH 6,7):

1,512 g PIPES, 7,5 ml CaCl_2 [1 M], 125 ml KCl [1 M], pH 6,7 mit KOH [1 M], Zugabe von 11 ml MnCl_2 [2,5 M], ad 0,5 l A. bidest., sterilfiltrieren

10x TBE (pH 8,0):

890 mM Tris (pH 7,5), 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA, A. bidest. (pH 8,0)

10x TBS (pH 7,6):

0,2 M Tris, 1,37 M NaCl, A. bidest. (pH 7,6)

1x TBST (pH 7,6):

0,1% (v/v) *Tween*[®] 20 R NF in 1x TBS

TE (pH 8,0):

10 mM Tris, A. bidest., pH 8,0 einstellen, dann 1 mM EDTA (pH 8,0)

Transferpuffer (*Western blot*):

25 mM Tris, 192 mM Glycin für die Elektrophorese, 20% (v/v) Methanol, A. bidest.

Trenngel (8 %) (für SDS-PAGE):

1,56 ml Unterer Gelpuffer, 1,6 ml Acrylamid/Bis-Acrylamid (30%, 37,5 : 1, entspricht 8%), 2,84 ml A. bidest., 6 μl TEMED, 12 μl APS-Lösung

Unterer Gelpuffer:

1,5 M Tris, 0,4% (w/v) SDS, A. bidest. (pH 8,8)

Waschpuffer für DYRK1B-*Western blots*:

1x TBS, 1% IGEPAL CA-630, 0,1% SDS, A. bidest.

1x Waschpuffer mit NP-40 (für Immunpräzipitation):

50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA (pH 8,0), 0,1% NP-40, A. bidest. (pH 7,4)

1x Waschpuffer ohne NP-40 (für Immunpräzipitation):

50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA (pH 8,0), A. bidest. (pH 7,4)

X-Gal-Lösung:

2% (w/v) X-Gal in Dimethylformamid (DMF)

2.2 Molekularbiologische Grundtechniken

Molekularbiologische Standardmethoden, wie z. B. Ethanolfällung und Restriktionsverdau, wurden nach „*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*“ (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt. Desoxyribonukleinsäure wurde mit Restriktionsenzymen der Firmen MBI Fermentas (Vilnius, Litauen) und Promega (Madison, USA) nach Herstellerangaben in geeigneten Puffern verdaut. Beim diagnostischen Verdau von Plasmid-DNA, die nach der „*Rapid boiling*“-Methode (Holmes & Quigley, 1981) isoliert wurde, wurde zum Abbau störender Ribonukleinsäuren RNase A (200 ng/μl Restriktionsansatz) zugesetzt.

2.2.1 Sterilisierung

Kulturmedien, Puffer und Pipettenspitzen wurden – sofern es die chemische Zusammensetzung zuließ – durch Autoklavieren (20 min/121°C) sterilisiert. Bei hitzeempfindlichen Substanzen wurde die Lösung durch ein 0,2 μm-Filter sterilfiltriert. Mögliche Keime und Enzyme an Glasgeräten, wie Erlenmeyer-Kolben, Reagenzgläsern und Messzylindern wurden durch 5-stündige Inkubation in einem Heizschrank bei 200°C zerstört.

2.2.2 Herstellung kompetenter *E. coli* DH5α (Hanahan, 1983)

Da in dem Bakterienstamm *E. coli* DH5α (F⁻, λ⁻, supE44, lacU169 (Φ80lacZ M15), hsdR17, gyrA96, thi-1, relA1 (Hanahan, 1983)) die Wahrscheinlichkeit der Rekombi-

nation innerhalb der klonierten DNA und die Endonukleaseaktivität (endA⁻) sehr gering sind, wurde er routinemäßig zur Transformation eingesetzt.

Nicht-kompetente *E. coli* DH5α wurden auf einer LB-Platte mit einer Impföse als Verdünnungsausstrich ausplattiert und ÜN bei 37°C wachsen gelassen. Einer der zahlreichen Klone wurde in 3 ml SOC-Medium als Vorkultur ÜT bei 37°C/ca. 200 rpm inkubiert. Abends wurden 400 µl Vorkultur zu 400 ml SOC-Medium gegeben und ÜN bei RT/100 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wuchsen die Bakterien unter starkem Schütteln bei RT bis zu einer OD ($\lambda \approx 600$ nm) von ca. 0,74 (Eppendorf, Hamburg). Das durch 5-minütige Zentrifugation bei 2.500 g/4°C („AvantiTM J-25“, Beckman, USA) erhaltene Bakterienpellet wurde in 50 ml kaltem TB aufgenommen, gevortext und nach 10-minütiger Inkubation auf Eis nochmals unter denselben Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Das *Pellet* wurde in 15 ml TB aufgenommen, gevortext und auf Eis gestellt. Nach Zugabe von DMSO in einer Endkonzentration von 7% wurde die Mischung 10 min lang auf Eis inkubiert, bevor sie in 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bei -72°C gelagert wurde. Um die Kompetenz der *E. coli* DH5α, d. h. ihre Fähigkeit zur Aufnahme von DNA, zu testen, wurden 50 µl *E. coli* DH5α mit 0,1 ng pWZL-neo² transformiert: nach einem Hitzeschock bei 42°C/30 s/60 s/90 s (Wasserbad) wurden sie kurz ins Eis gestellt, mit 450 µl LB-Medium vermischt und 30 min lang bei 37°C/ca. 200 rpm inkubiert. Nachdem 450 µl der Mischung verworfen worden waren, wurden die verbleibenden 50 µl auf LB_{Amp}-Platten ausgestrichen und ÜN bei 37°C wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden infolge 60-sekündigem Hitzeschock bei der Transformation ca. $1,5 \times 10^7$ cfu (Kolonie-bildende Einheiten)/µg DNA gezählt, was die erworbene Kompetenz der Zellen bewies.

2.2.3 Chemische Transformation kompetenter *E. coli* und Isolierung von Plasmid-DNA

Kompetente *E. coli*-Zellen (100 µl) wurden auf Eis aufgetaut und mit der DNA 15 min lang auf Eis inkubiert, einem 60- bis 90-sekündigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und mit 500 µl LB-Medium (ohne Ampicillin) versetzt. Diese Suspension wurde

² http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/retsys.html

30 bis 40 min lang bei 37°C/ca. 200 rpm inkubiert und kurz zentrifugiert (ca. 30 s/Höchstgeschwindigkeit/RT, Tischzentrifuge „Sigma 112“, Laborzentrifugen GmbH, Osterode/Harz). Nachdem maximal 500 µl der Mischung verworfen worden waren, wurde die verbleibende Bakteriensuspension auf LB_{Amp}-Platten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 37°C.

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurde auf die „*Rapid boiling*“-Methode (Holmes & Quigley, 1981) zurückgegriffen (Mini-Präparation). Größere Mengen RNA-freier Plasmid-DNA (ca. 25 bis 900 µg) wurden mittels Midi- oder Maxi-Präparationskit (Qiagen, Hilden) gewonnen (Zentrifugation in „*Avanti*TM J-25“ und „*J2-21*“, Beckman, USA). Die Konzentration der DNA wurde UV-photometrisch ($\lambda = 260$ nm, „*GeneQuant II*“, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) bestimmt.

2.2.4 Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion zur Analyse von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung (8 V/cm) von durch Restriktionsverdau entstandenen DNA-Fragmenten in 1x Orange G-*Gelloading Buffer* und PCR-Produkten erfolgte in 0,7% - 1,5% (w/v)-Agarosegelen in 1x TAE, denen 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt wurde. Als Größenstandards dienten die Fragmente der „*GeneRuler*TM 1kb DNA-Ladder“, der „*GeneRuler*TM 100bp Ladder Plus“ bzw. der „*MassRuler*TM DNA Ladder, Mix, ready-to-use“. Nach der Elektrophorese wurde das erwünschte Fragment über UV-Licht mittels Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde dann mit Hilfe des „*QIAquick Gel Extraction Kits*“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers eluiert. Zur Elution wurden üblicherweise 30 bzw. 50 µl A. bidest. verwendet.

2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von verdauten DNA-Fragmenten erfolgte in unterschiedlichen Endvolumina, bestehend aus 2 u (bei überhängenden Enden) bzw. 4 u (bei glatten Enden) T4-DNA-Ligase, 1x „*Ligation Buffer*“ (beide MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) und unterschiedlichen Mengen verdauter Vektor- und *Insert*-DNA in A. bidest. Zur Bestimmung der Rate der Transformanden, die das Plasmid ohne *Insert* besaßen, wurde A. bidest. anstatt cDNA-*Insert* zugegeben, sodass die Vektor-DNA religierte.

Mit den ÜN bei 16°C inkubierten Ansätzen wurden kompetente *E. coli*-Zellen transformiert, aus denen schließlich das gewünschte Konstrukt mittels Mini- und Midi- bzw. Maxipräparation gewonnen wurde. Zur Kontrolle folgten ein Restriktionsverdau und eine elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel.

2.2.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von mittels Ethanolfällung aufgereinigter Plasmid-DNA (Maxi-Präparation) wurde nach der Didesoxynukleotid-Methode (Sanger *et al.*, 1992) mit Fluoreszenz-markierten Nukleotiden (ABI-Methode) durchgeführt. Zur Sequenzierung wurde das „ABI PRISM BigDye® Primer Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems, Foster City, USA) benutzt: 0,5 µg DNA (Maxi-Präparation), 4 µl *Premix*, 5 pmol *Primer* (*forward*- oder *reverse-Primer*), gegebenenfalls DMSO (3% - 9%), LiChrosolv® Wasser für die Chromatographie ad 10 µl (25x (30 s/96°C, 15 s/58°C, 4 min/60°C), bis zur Ausschaltung des Gerätes 4°C). Nach der PCR erfolgte eine Ethanolfällung und die Aufnahme des DNA-*Pellets* in 20 µl LiChrosolv® Wasser für die Chromatographie. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte über eine Kapillare im Sequenziergerät „ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer“ (Applied Biosystems, Weiterstadt).

2.2.7 Isolierung genomischer DNA aus Säugetier-Zelllinien

Zur Isolierung genomischer DNA aus den humanen Zelllinien HEK 293 und SAOS-2 wurde das „InViSorb™ Genomic DNA Kit II“ (InViTek GmbH, Berlin) verwendet. Das Hersteller-Protokoll für die DNA-Isolierung aus Mausschwanz wurde hierzu etwas modifiziert. Ungefähr zu 75% konfluente Zellen auf einer 6 cm-Platte (NUNC™, Roskilde, Dänemark) wurden mit 3 ml eiskaltem PBS gewaschen, bevor sie in einer Mischung aus 300 µl „Lysis Buffer G“ (zuvor 5 min/50°C) und 20 µl Proteinase K abgeschabt und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt wurden. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren erfolgte eine zweistündige Inkubation bei 60°C unter zeitweise leichtem Schütteln im Heizblock („Thermomixer compact“, Eppendorf, Hamburg). Zur Pelletierung unlöslicher Partikel wurde zweimal zentrifugiert (1 min/14.000 rpm/RT,

Eppendorf-Tischzentrifuge „5417R“) und der Zellüberstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 600 µl gut durchmischem Bindungspuffer wurde kurz gevortext und 3 min lang bei RT inkubiert, bevor die Pelletierung des Trägermaterials (1 s/Höchstgeschwindigkeit/RT, Tischzentrifuge „Sigma 112“, Laborzentrifugen GmbH, Osterode/Harz) erfolgte. Der Überstand wurde abgesaugt, das weiße *Pellet* mit 1 ml Waschpuffer kurz gevortext (keine vollständige Resuspendierung) und abzentrifugiert (1 s/Höchstgeschwindigkeit/RT, „Sigma 112“, Laborzentrifugen GmbH, Osterode/Harz). Der Überstand wurde abgesaugt und die Waschung wiederholt. Nach der Absaugung des Überstandes wurde das Mikroreaktionsgefäß mit dem DNA-*Pellet* bei offenem Deckel einige Minuten lang im Heizblock (s. o.) bei 60°C inkubiert, um eine Verflüchtigung des Alkohols zu erzielen. Das noch nicht eingetrocknete *Pellet* wurde mit 320 µl „*Elution buffer D*“ (60°C warm) versetzt, kurz gevortext und 3 min lang bei 60°C inkubiert. Nach Zentrifugation (1 min/14.000 rpm/RT, Eppendorf-Tischzentrifuge „5417R“) wurden 300 µl des DNA-haltigen Überstandes in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (2 min/14.000 rpm/RT, Eppendorf-Tischzentrifuge „5417R“), um eine hohe Reinheit des Überstandes zu gewährleisten. Die Konzentration der DNA wurde UV-photometrisch ($\lambda = 260$ nm, „*GeneQuant II*“, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) bestimmt. Eine Stammlösung der Konzentration 50 ng/µl wurde bei -20°C gelagert.

2.2.8 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugetier-Zelllinien

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugetier-Zelllinien wurde das „*RNeasy Mini Kit*“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben benutzt. Es wurde die Tischzentrifuge „Sigma 112“ (Laborzentrifugen GmbH, Osterode/Harz) genutzt. Die Konzentration der RNA wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm UV-photometrisch („*GeneQuant II*“, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) bestimmt.

2.2.9 Agarosegelelektrophorese zur RNA-Analyse

15 µg RNA wurden mit dem 0,1-fachen Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und dem auf das entstandene Volumen bezogenen 2,5-fachen Volumen Ethanol absolut ÜN

bei ca. -80 °C gefällt. Das durch Zentrifugation (mindestens 15 min/14.000 rpm/4 °C, Eppendorf-Tischzentrifuge „5417R“) entstandene RNA-*Pellet* wurde in 20 µl RNA-Probenpuffer aufgenommen und 45 bis 60 min lang bei 63 °C unter kräftigem Schütteln („Thermomixer compact“, Eppendorf, Hamburg) und mehrmaligem Vortexen und Abzentrifugieren bei RT (Tischzentrifuge „Sigma 112“, Laborzentrifugen GmbH, Osterode/Harz) denaturiert. Die RNA wurde in einem 1%-Agarosegel für *Northern blot* aufgetrennt. Die Agarose wurde in 218 ml (Endvolumen 250 ml) bzw. in 70 ml (Endvolumen 80 ml) DEPC-behandeltem A. bidest. aufgekocht, unter Rühren auf 60 °C abgekühlt und vor dem Gießen mit 25 ml bzw. 8 ml 10x MOPS und 7,5 ml bzw. 2,4 ml Formaldehyd (pH 4,0) versetzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte 3 h lang in 1x MOPS-Laufpuffer in einer Gelkammer mit den Abmessungen 6,5 cm x 9 cm bei ca. 100 V (Biometra, Göttingen) oder in einer großen Gelkammer mit den Abmessungen 16 cm x 30 cm bei ca. 125 V.

2.3 Klonierungen

2.3.1 Umklonierung von drei DYRK1B-Spleißvarianten

Zur Erzeugung von Retroviren, die die cDNAs der Spleißvarianten DYRK1B-p65, -p69 bzw. -p75 der humanen Proteinkinase DYRK1B (Leder *et al.*, 2003) tragen, war die Klonierung dieser cDNAs in die „*multiple cloning site*“ (MCS) des retroviralen Vektors pWZL-neo³ erforderlich. Er wurde unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von Herrn Dr. Andreas Barthel zur Verfügung gestellt.

Aus dem Plasmid pGEX-2TK-hDyrk1B *short* (Leder *et al.*, 1999) wurde die cDNA der humanen DYRK1B-p65, einer Spleißvariante von DYRK1B-p69, der die Basenpaare 1.376 bis 1.495 fehlen, mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in den zuvor mit *Bam*HI und *Mun*I verdauten Vektor pWZL-neo kloniert (Abb. 2.1).

³ http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/retsys.html

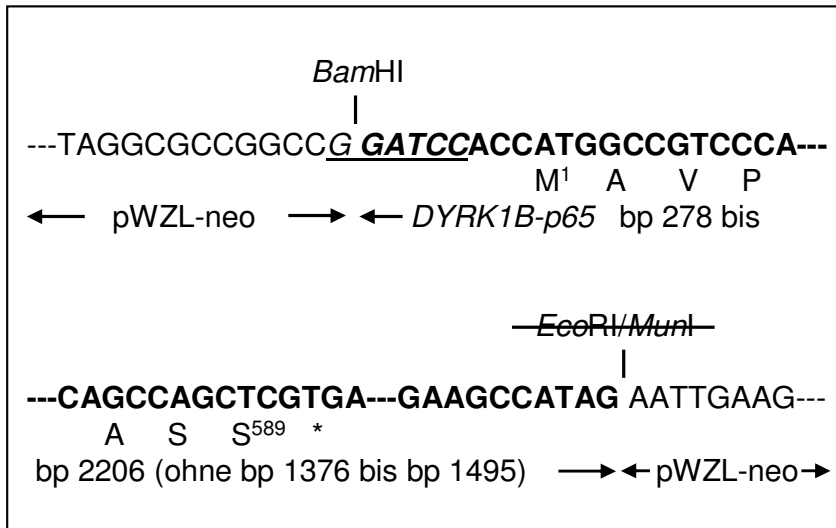


Abb. 2.1: Schema von pWZL-neo-DYRK1B-p65

Die intake Restriktionsschnittstelle ist kursiv und unterstrichen dargestellt. *: Stoppcodon.

Die Aminosäuresequenz von DYRK1B-p65 steht unterhalb der Nukleotidsequenz.

Aus dem Plasmid pGEX-2TK-hDyrk1B (GenBank[®]-Nr. Y17999) (Leder *et al.*, 1999) wurde die cDNA der humanen DYRK1B-p69 mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in den zuvor mit *Bam*HI und *Eco*RI verdauten Vektor pWZL-neo kloniert (Abb. 2.2).

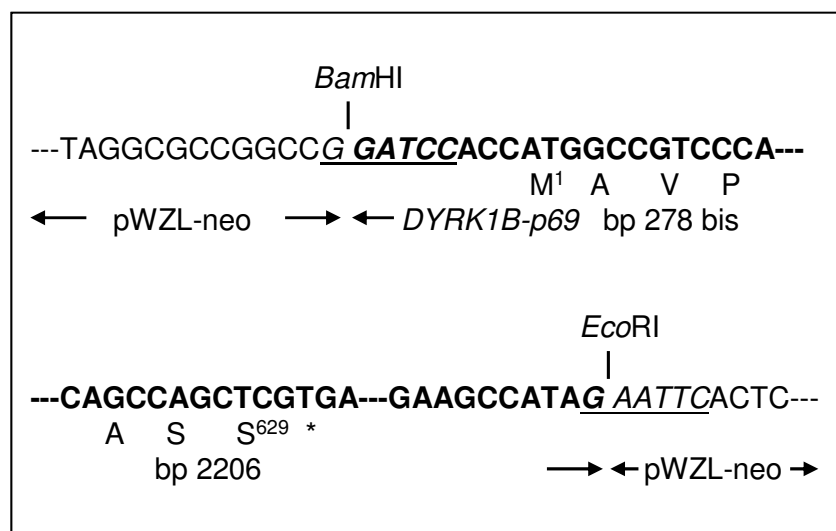


Abb. 2.2: Schema von pWZL-neo-DYRK1B-p69

Intake Restriktionsschnittstellen sind kursiv und unterstrichen dargestellt. *: Stoppcodon.

Die Aminosäuresequenz von DYRK1B-p69 steht unterhalb der Nukleotidsequenz.

Aus dem Plasmid pCMV•SPORT6-DYRK1B-p75 (GenBank® „Nucleotide Sequence Database accession number“ AL524061, Research Genetics, Huntsville, USA), das den gesamten Offenen Leserahmen (ORF) von DYRK1B-p75 (EST aus humanem Neuroblastom) enthält, wurde die DYRK1B-p75-cDNA mit *EcoRI* und *XhoI* herausgeschnitten und in den zuvor mit *EcoRI* und *XhoI* verdauten Vektor pWZL-neo kloniert. Vor dem Startcodon befinden sich ca. 10 bp unbekannter Sequenz (Abb. 2.3).

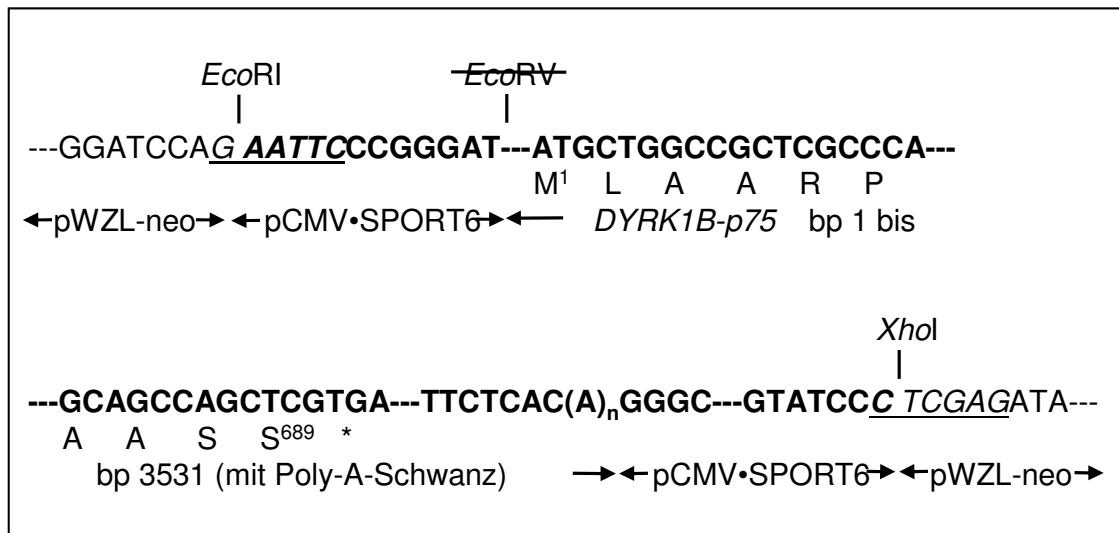


Abb. 2.3: Schema von pWZL-neo-DYRK1B-p75

Intake Restriktionsschnittstellen sind kursiv und unterstrichen dargestellt. *: Stoppcodon.

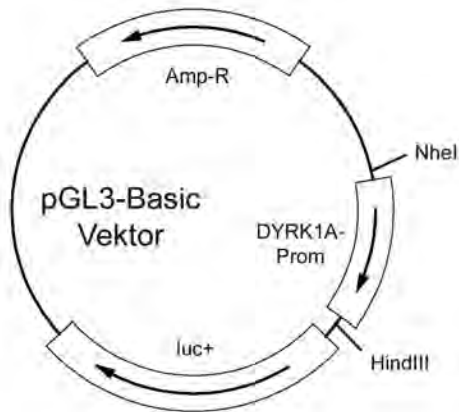
Die Aminosäuresequenz von DYRK1B-p75 steht unterhalb der Nukleotidsequenz.

2.3.2 Klonierung von *DYRK1A*-Promotorfragmenten

Die drei möglichen Promotoren des *DYRK1A*-Gens, d. h. der Bereich vor Exon 1 nach Guimerà und Kollegen (1999) („Exon1G“) sowie die Regionen *upstream* von den durch 5'-RACE-PCR identifizierten Transkriptionsstarts (TS) A bzw. B, wurden für die Klonierung in die MCS des Reportergenvektors pGL3-Basic (Promega, Madison, USA) mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) (Mullis *et al.*, 1986) auf genomischer DNA (*Template*) aus HEK 293-Zellen amplifiziert (Abb. 2.4, Tab. 2.1, Tab. 2.2). Die Konstrukte pGL3-hDYRK1A-226, -114 und -23 wurden von Frau Ana-Lena Reiners hergestellt (s. Forschungsbericht dieser Forschungspraktikantin).

Die Promotorkonstrukte wurden folgendermaßen benannt: pGL3-hDYRK1A-(Anzahl der auf Promotoraktivität getesteten Basenpaare *upstream* von TS B) bzw. pGL3-hDYRK1A-A oder -B bzw. pGL3-hDYRK1A-Exon1G (827 bp *upstream* von Exon1G).

A



B

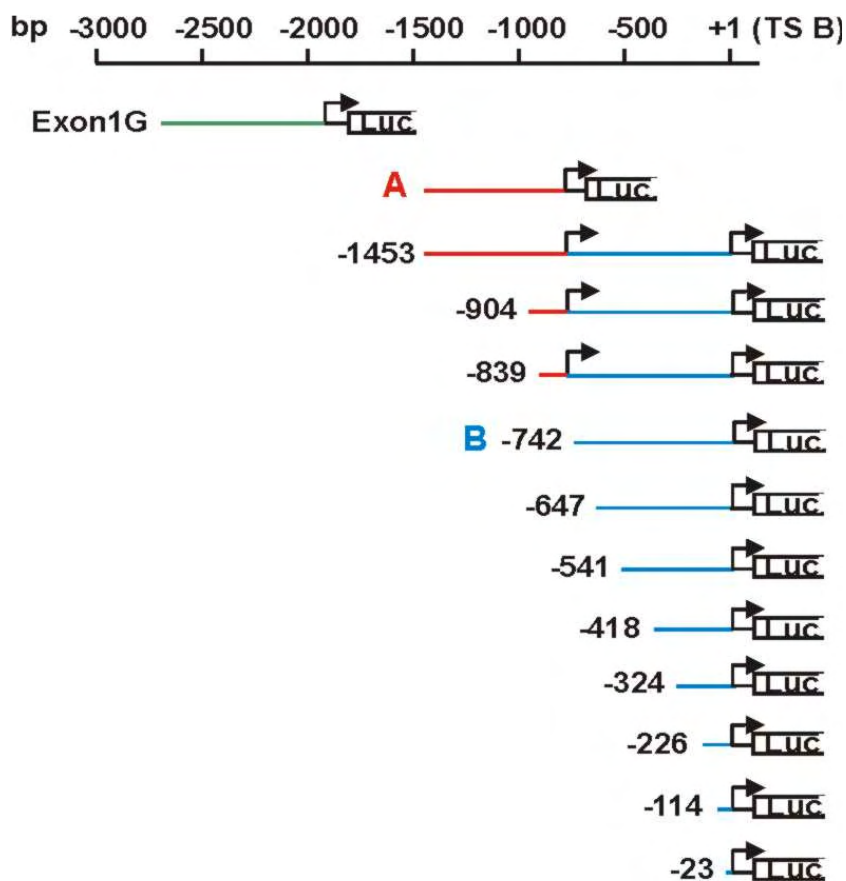


Abb. 2.4: Schemata des pGL3-Basic-Reportergenvektors mit *DYRK1A*-Promotor-Insert und der in pGL3-Basic klonierten *DYRK1A*-cDNA-Sequenzen

A: Amp-R: Gen für Ampicillin-Resistenz; DYRK1A-Prom: Nukleotidsequenz der *DYRK1A*-Promotor-region; *NheI* bzw. *HindIII*: Restriktionsschnittstellen der Enzyme *NheI* bzw. *HindIII*; *luc*⁺: Luciferase-Gen.

B: TS B: Transkriptionsstart B; schwarze Pfeile: mutmaßliche Transkriptionsstarts (links: TS in Exon1G, Mitte: TS A, rechts: TS B (+1)); Zahlen: Länge der *Inserts* in Bezug auf TS B.

Tab. 2.1: Oligonukleotide zur Klonierung und Sequenzierung der *DYRK1A*-Promotorkonstrukte

In Klammern sind die laborinternen Bezeichnungen angegeben. Fett gedruckte Buchstaben markieren Basen, die zur Klonierung eingefügt wurden. Unterstrichene Basen sind Erkennungssequenzen für die angegebenen Restriktionsenzyme. (Seq.): weiterer *Primer* zur Sequenzierung; VS: Vorstufe.

Oligonukleotid (<i>Primer</i>)	Sequenz 5' → 3'	Restriktions- enzym	Konstrukt- name (pGL3- hDYRK1A-...)
PromoEx1G.for	AATT<u>GCTAGC</u> TTGGTTGTATAGGTGGAAGC	<i>NheI</i>	Exon1G/-VS (Exon1Gk/f)
PromoEx1G.rev	AATTAAGCTT CAGAGTCTTAATTCGCCTGC	<i>HindIII</i>	Exon1G-VS (Exon1Gf)
Exon1G.rev	AATT<u>AGATCT</u> CAGAGTCTTAATTCGCCTGC	<i>BglII</i>	Exon1G (Exon1Gk)
BMaPromoD1A.for (a.for)	AATT<u>GCTAGC</u> TTCGAAGAACCGGCTCCACG	<i>NheI</i>	1453 bzw. A (a bzw. A)
BMaPromoD1Aneu. rev	ACGTGCTGACGTCCTCCTCC (Seq.)		
BM_a_rev_0805	AATTGTGAAGGATAAATTCGGAGC (Seq.)		
BMbPromoD1A.for (b.for)	AATT<u>GCTAGC</u> GAACGGAATCTGCCGTTACC	<i>NheI</i>	904 (b)
hD1A900forBM (w.for)	AATT<u>GCTAGC</u> GAGGACGTCAGCACGTCAGC	<i>NheI</i>	839 (w)
D1A-700r (A.rev)	TTAAAAGCTT CAACAAAATGGCGAC	<i>HindIII</i>	A
hD1A800forBM (B.for)	AATT<u>GCTAGC</u> TAAACCCTTTGCTTCCCGC	<i>NheI</i>	B (x)
hD1A700forBM (y.for)	AATT<u>GCTAGC</u> ACTGCTGCTGTGCTGCTGC	<i>NheI</i>	647 (y)
hD1A600forBM (z.for)	AATT<u>GCTAGC</u> CCTGCTGCTGCTGTTGGTGC	<i>NheI</i>	541 (z)
BMcPromoD1A.for (c.for)	AATT<u>GCTAGC</u> GAGTGTCTGTCTGTCTGTGC	<i>NheI</i>	418 (c)
cD1A400for (d.for)	AATT<u>GCTAGC</u> CGCTGCGCAGGTCGGAGC	<i>NheI</i>	324 (d)
cD1A300for (e.for)	AATT<u>GCTAGC</u> GCCGACGCCGCCCTCTGC	<i>NheI</i>	226 (e)
cD1A100for (f.for)	AATT<u>GCTAGC</u> GCCGCTGGAACCGCGAGC	<i>NheI</i>	114 (f)
cD1A100for (g.for)	AATT<u>GCTAGC</u> GCGCTGGCTGCG	<i>NheI</i>	23 (g)
BMPromoD1A.rev (B.rev)	AATTAAGCTT TTCTCCGGTGAGTCTCAGC	<i>HindIII</i>	alle außer A, Exon1G/-VS

Die Klonierung von Exon1G in pGL3-Basic startete mit folgendem PCR-Ansatz: 1x Puffer für „*JumpStart REDAccu TaqTM DNA Polymerase*“ (Sigma), 500 µM dNTP, 1 µM PromoEx1G.for, 1 µM PromoEx1G.rev, 36,5 µl A. bidest., 0,125 u „*JumpStart REDAccu TaqTM DNA Polymerase*“ (Sigma), 200 ng genomische DNA aus HEK 293-Zellen (Tab. 2.1, Tab. 2.2). Aufgrund dreier *HindIII*-Restriktionsschnittstellen im *Insert* Exon1G konnte keine Klonierung mit überhängenden Enden in pGL3-Basic durchgeführt werden. Stattdessen erhielt das PCR-Produkt mittels „*Sure CloneTM Ligation Kit*“ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) glatte Enden und eine Phosphorylierung am 5'-Ende und wurde nach Aufreinigung nach Herstellerangaben mit der glatte, unphosphorylierte Enden aufweisenden Vektor-DNA (pGL3-Basic) ligiert. Nach der Transformation kompetenter *E.coli* DH5α lieferte der Kontrollverdau der Mini-Präparation mit *HindIII* aufgrund der drei im *Insert* befindlichen *HindIII*-Restriktionsschnittstellen keine Aussage über die Orientierung des Exon1G-*Inserts* im Vektor pGL3-Basic. Die entsprechende Maxi-Präparation diente als *Template* einer neuen PCR (4 ng DNA, *Primer-Annealing* 1 min/55°C, 35 Zyklen, sonst gleiche Bedingungen wie zuvor), allerdings mit dem Rückwärts-*Primer* Exon1G.rev, der eine *BglII*-Schnittstelle statt einer *HindIII*-Schnittstelle aufweist. Nun war eine Klonierung mit überhängenden Enden in pGL3-Basic nach einer Zwischenklonierung in pUC18 mit dem „*Sure CloneTM Ligation Kit*“ nach Herstellerangaben möglich (Tab. 2.1, Tab. 2.2, Abb. 3.1). Nach Blau-Weiß-Selektion (2% X-Gal auf der LB_{Amp}-Platte) wurden Mini-Präparationen durchgeführt. Das *Insert* wurde mit pGL3-Basic mit überhängenden Enden ligiert (Abb. 2.5). Der Kontrollverdau der Mini- und Maxi-Präparation ergab eine korrekte Orientierung des Exon1G-*Inserts* im Vektor. Das Konstrukt wurde komplett sequenziert (Tab. 2.3).

Nach obigem Schema – allerdings mit 9% DMSO zusätzlich, da dies das *Annealing* der *Primer* (Oligonukleotide) (Tab. 2.1) bei GC-reichen Nukleotidsequenzen erleichtert – wurden die PCRs zur Klonierung von pGL3-hDYRK1A-1453, -904 und -418 durchgeführt (Tab. 2.2, Abb. 3.1). Die PCR-Produkte wurden mit dem „*Sure CloneTM Ligation Kit*“ in pUC18 zwischenkloniert (s. o., Blau-Weiß-Selektion). Die Konstrukte pGL3-hDYRK1A-1453 und -418 wurden komplett sequenziert, pGL3-hDYRK1A-904 wurde teilsequenziert (Tab. 2.4). Das auf der cDNA des Konstruktes pGL3-hDYRK1A-1453 mit -1453.for und A.rev (Tab. 2.1) sowie ebenfalls 9% DMSO amplifizierte A-*Insert* wurde auf direktem Weg mit überhängenden Enden mit pGL3-

Basic ligiert (Tab. 2.2, Abb. 2.6 A, Abb. 3.1). Das Konstrukt pGL3-hDYRK1A-A wurde komplett sequenziert (Tab. 2.4).

Die mit PCR auf 2,5 ng pGL3-hDYRK1A-1453 mit 9% DMSO und „1x *REDTaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix With MgCl₂*“ (Sigma) nach Herstellerangaben amplifizierten restlichen *Inserts* wurden mittels „*Sure Clone™ Ligation Kit*“ in pUC18 zwischenkloniert (s. o., Blau-Weiß-Selektion) und mit überhängenden Enden mit pGL3-Basic ligiert (Tab. 2.1, Tab. 2.2, pGL3-hDYRK1A-B in Abb. 2.6 B, Abb. 3.1). Die Konstrukte pGL3-hDYRK1A-B, -226, -114 und -23 wurden komplett sequenziert, pGL3-hDYRK1A-839, -647, -541 und -324 wurden teilsequenziert (Tab. 2.4). Die PCRs wurden im „*Thermocycler*“ („Primus 96 plus“, MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Die erste Denaturierung erfolgte 5 min lang bei 95°C, die Denaturierung während der Zyklen erfolgte 60 s lang bei 95°C, die End-Elongation 5 min lang bei 72°C, gefolgt von einer Phase unbestimmter Länge bei 4°C. Die Resultate der Sequenzierungen sind in Tab. 2.3 und Tab. 2.4 dargestellt.

Tab. 2.2: PCR-Bedingungen zur Klonierung der drei mutmaßlichen Promotoren des humanen *DYRK1A*-Gens

Angegeben sind die Labor-internen *Primer*-Bezeichnungen.

Konstrukt	Primer-Paar	Template	DMSO (9%)	Annealing Elongation (Zykluszahl)
pGL3-hDYRK1A-Exon1G-Vorstufe	PromoEx1G.for PromoEx1G.rev	genomische DNA aus HEK 293	nein	60 s 58°C 60 s 72°C (35)
pGL3-hDYRK1A-Exon1G	PromoEx1G.for Exon1G.rev	pGL3-Exon1G-Vorstufe	nein	60 s 55°C 60 s 72°C (35)
pGL3-hDYRK1A-A	-1453.for/ A.rev	pGL3-hDYRK1A-1453	ja	60 s 55°C 60 s 72°C (35)
pGL3-hDYRK1A-1453	-1453.for/ B.rev	genomische DNA aus HEK 293	ja	60 s 58°C 90 s 72°C (35)
pGL3-hDYRK1A-904 bzw. -418	-904.for/B.rev -418.for/B.rev	genomische DNA aus HEK 293	ja	60 s 58°C 60 s 72°C (35)
pGL3-hDYRK1A-839, -B, -647, -541, -324, -226, -114 bzw. -23	-839.for/B.rev B.for/B.rev -647.for/B.rev -541.for/B.rev -324.for/B.rev -226.for/B.rev -114.for/B.rev -23.for/B.rev	pGL3-hDYRK1A-1453	ja	60 s 61°C (59°C: pGL3-hDYRK1A-114 und -23) 60 s 72°C (30)

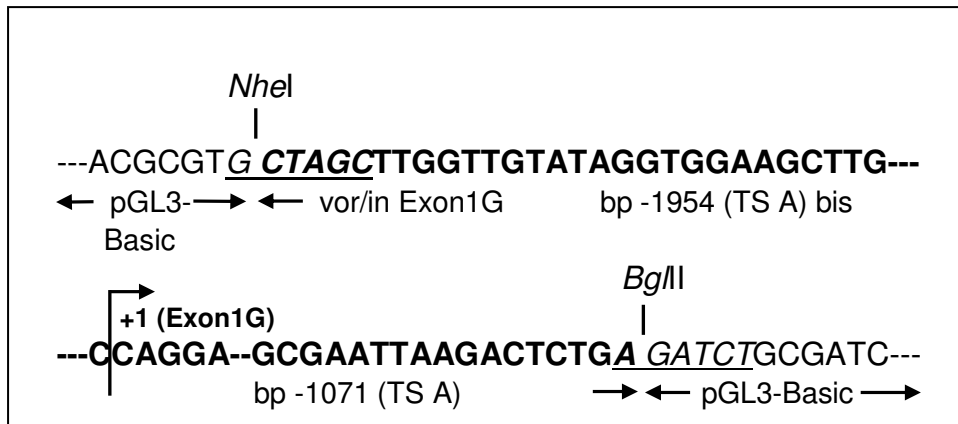


Abb. 2.5: Schema von pGL3-hDYRK1A-Exon1G

Intake Restriktionsschnittstellen sind kursiv und unterstrichen dargestellt;
(TS A): bezieht sich auf TS A.

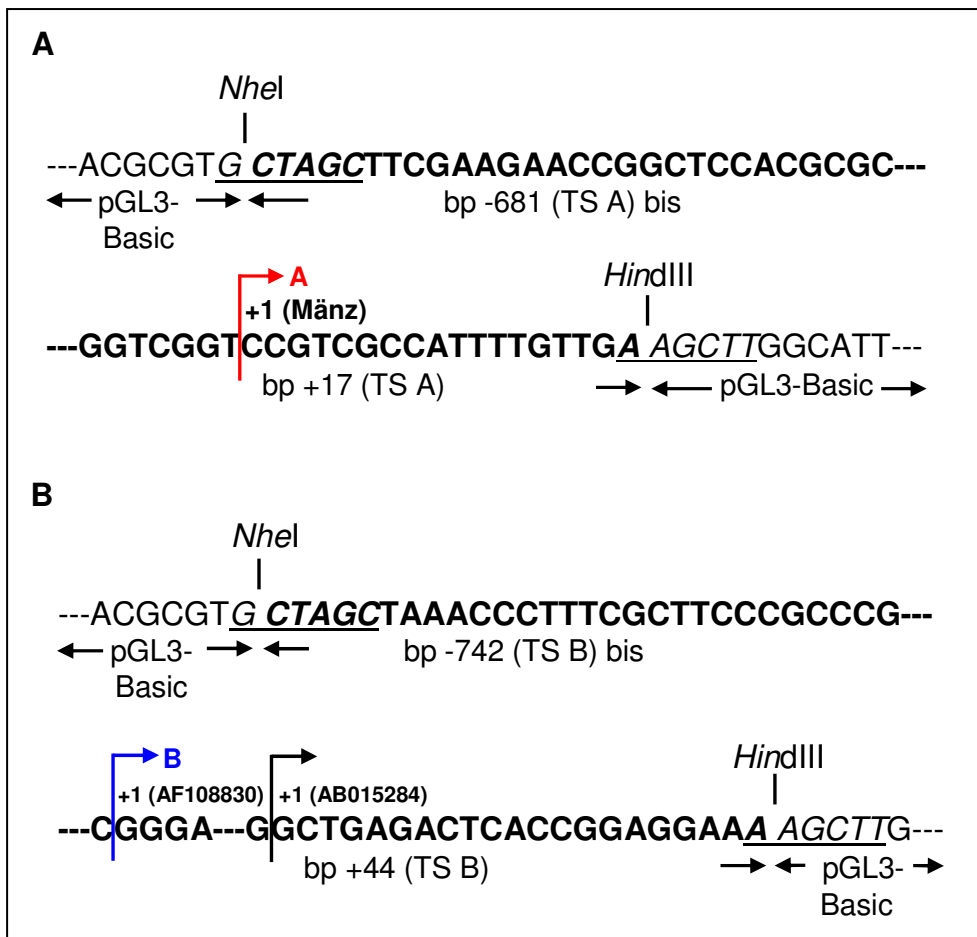


Abb. 2.6: Schemata von pGL3-hDYRK1A-A und pGL3-hDYRK1A-B

Intake Restriktionsschnittstellen sind kursiv und unterstrichen dargestellt;
(TS A): bezieht sich auf TS A; (TS B): bezieht sich auf TS B; AF.../AB...: GenBank®-Nummern.

Tab. 2.3: Sequenzierungen von pGL3-hDYRK1A-Exon1G und dessen Vorstufe

Konstrukt	5' → 3' sequenziert	3' → 5' sequenziert	Fehlerzahl	Ort / Art des Fehlers	Bemerkungen
Exon1G-Vorstufe <i>Template:</i> genomische DNA (HEK 293)	ja	ja	3	-2562 C statt T, -2393 T fehlend, -2375 G statt A	<ul style="list-style-type: none"> • Orientierung des Inserts unklar • komplett sequenziert
Exon1G <i>Template:</i> Exon1G	ja	ja	3	-2562 C statt T, -2393 T fehlend, -2375 G statt A	<ul style="list-style-type: none"> • Insert korrekt orientiert • komplett sequenziert

Tab. 2.4: Sequenzierungen von pGL3-hDYRK1A-A, -B, der Konstrukte mit beiden Transkriptionsstarts sowie der 5'-Deletionskonstrukte von *DYRK1A*-Promotor B

Konstrukt	5' → 3' sequenziert	3' → 5' sequenziert	Fehlerzahl	Ort [bp] / Art des Fehlers	Bemerkungen
A <i>Template:</i> -1453	ja	ja	3	-1292 T statt C, -938 C statt T, -808 C statt G	komplett sequenziert
B <i>Template:</i> -1453	ja	ja	1	-684 A statt G	komplett sequenziert
-1453 <i>Template:</i> genomische DNA (HEK 293)	ja	ja	1	-938 C statt T	komplett sequenziert
-904 <i>Template:</i> genomische DNA (HEK 293)	ja	nein	1	-676 T statt C	-501 bis TS B nicht sequenziert
-839 <i>Template:</i> -1453	ja	nein	0	/	<ul style="list-style-type: none"> • am 5'-Ende ca. 30 bp nicht sequenziert • -543 bis TS B nicht sequenziert • -627/-628 keine Aussage möglich
-647 <i>Template:</i> -1453	nein	ja	1	-301 G fehlend	5'-Ende bis -307 nicht sequenziert
-541 <i>Template:</i> -1453	nein	ja	2	zwischen -276 und -275 C zusätzlich, -11 G fehlend	5'-Ende bis -301 nicht sequenziert
-418 <i>Template:</i> genomische DNA (HEK 293)	ja	nein	2	-179 A statt G, -13 T statt C	komplett sequenziert
-324 <i>Template:</i> -1453	nein	ja	2	-191 C statt G, zwischen -9 und -8 T zusätzlich	<ul style="list-style-type: none"> • -60 keine Aussage möglich • 5'-Ende bis -220 nicht sequenziert
-226 <i>Template:</i> -1453	ja	nein	0	/	komplett sequenziert
-114 <i>Template:</i> -1453	nein	ja	0	/	komplett sequenziert
-23 <i>Template:</i> -1453	nein	ja	0	/	komplett sequenziert

2.4 Kultivierung von Säugetier-Zelllinien

2.4.1 Säugetier-Zelllinien

Tab. 2.5: Übersicht der kultivierten adhärenenten Zelllinien

Zelllinie	Organismus/Gewebe	Herkunft
COS-7	Afrikanische Grüne Meerkatze/Niere	ATCC (CRL-1651), Manassas, USA
GT1-7	Maus/Hypothalamus	Prof. H. Jarry, Göttingen
HEK 293	Mensch/embryonale Niere	Prof. A. Schürmann, Nuthetal
HeLa	Mensch/Zervixkarzinom	Dr. A. Barthel, Düsseldorf
INS-1	Ratte/Insulinom (Betazellen)	Dr. H. Neye, Münster
NIH-3T3	Maus/embryonale Fibroblasten	Prof. A. Schürmann, Nuthetal
PC-12	Ratte/Phäochromocytom	Dr. R. Hausmann, Aachen
PC-3	Mensch/Adenokarzinom der Prostata	DSMZ (Acc 465), Braunschweig
Phoenix™	Mensch/embryonale Niere, „Verpackungs-Zelllinie“	Dr. A. Barthel, Düsseldorf
SAOS-2	Mensch/Osteosarkom, Tet-On-System für E2F1: stabil transfizierter Doxycyclin-responsiver <i>E2F1</i> -Promotor	Prof. K. Vousden, Glasgow (Bates <i>et al.</i> , 1998)

Darüber hinaus wurden mir freundlicherweise native Zelllysate aus HIT-T15-Zellen (Hamster) und RINm5F-Zellen (Ratte) für *Western blots* von Frau Simone Bamberg-Lemper und Herrn Dr. Paul Hekerman zur Verfügung gestellt.

2.4.2 Medien und allgemeine Kulturbedingungen

Die adhärenenten Säugetierzellen wurden in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre (5% CO₂) bei 37 °C kultiviert. Die Zellen wurden in 80 cm²-Kulturflaschen („Nunc-*lon*TMΔ-Surface“, NUNC, Roskilde, Dänemark) mit 10 ml sterilfiltriertem Zellkulturmedium gehalten (Tab. 2.6). Das Medium wurde in einem zwei- bis dreitägigen Intervall erneuert. „DMEM (1x) High Glucose With Sodium Pyruvate and L-Glutamine“, „RPMI 1640 (1x) With L-Glutamine“, „Ham’s F-12 without L-Glutamine“, „Fetal Calf Serum (FCS), virus screened“ und „Horse Serum“ wurden von PAA Laboratories (Linz, Österreich) bezogen, „Trypsin-EDTA Solution (10x)“ von Gibco BRL (Eggenstein) und 2-Mercaptoethanol von Merck (Darmstadt). Allen Zellkulturmedien wurde 1% „Penicillin/Streptomycin Solution“ (Invitrogen, Karlsruhe) zugesetzt.

Tab. 2.6: Übersicht der verwendeten Zellkulturmedien (Normalmedien)

Zelllinie	Zellkulturmedium
COS-7	„DMEM (1x) High Glucose With Sodium Pyruvate and L-Glutamine“, 10% FCS
GT1-7	„DMEM (1x) High Glucose With Sodium Pyruvate and L-Glutamine“, 10% FCS
HEK 293	„DMEM (1x) High Glucose With Sodium Pyruvate and L-Glutamine“, 10% FCS
HeLa	„RPMI 1640 (1x) With L-Glutamine“, 10% FCS
INS-1	„RPMI 1640 (1x) With L-Glutamine“, 50 µM 2-Mercaptoethanol, 10 mM HEPES, 1 mM Natriumpyruvat, 10% FCS
NIH-3T3	„DMEM (1x) High Glucose With Sodium Pyruvate and L-Glutamine“, 10% FCS
PC-12	„DMEM (1x) High Glucose With Sodium Pyruvate and L-Glutamine“, 10% „Horse serum“ und 5% FCS
PC-3	„RPMI 1640 (1x) With L-Glutamine“ mit 44,5% „Ham’s F-12 without L-Glutamine“, 10% FCS
Phoenix TM	„DMEM (1x) High Glucose With Sodium Pyruvate and L-Glutamine“, 10% FCS
SAOS-2	„DMEM (1x) High Glucose With Sodium Pyruvate and L-Glutamine“, 10% FCS

2.4.3 Kryokonservierung

Auftauen

Ein zuvor in flüssigem Stickstoff gelagertes Kryokonservierungsröhrchen (NUNC, Roskilde, Dänemark) wurde zum Schutz vor Kontaminationen mit Parafilm umklebt und/oder mit Ethanol 70% desinfiziert, bevor die Zellen einige Minuten lang im Wasserbad bei 37°C auftauten. Anschließend wurden sie in ein 15 ml-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt, in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und 5 min lang bei ca. 1.000 rpm/RT in einer Tischzentrifuge („Sigma 3E-1“, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode/Harz) pelletiert. Die Zellen wurden in 10 ml frischem Kulturmedium in einer 80 cm²-Kulturflasche ausgesät.

Einfrieren (Kryokonservierung)

Zur Aufrechterhaltung möglichst gleicher Versuchsbedingungen wurden Zellen niedriger Passagenzahl eingefroren. Nach Waschen mit 10 ml PBS (37°C) wurden die Zellen mit 1 ml „*Trypsin-EDTA Solution*“ (1x in PBS; 37°C) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Röhrchen überführt und 5 min lang bei ca. 1.000 rpm/RT in einer Tischzentrifuge („Sigma 3E-1“, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode/Harz) pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 2 ml FCS mit 10% (v/v) DMSO aufgenommen und resuspendiert. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Kryokonservierungsröhrchen pipettiert. Die Zellen wurden in einem Einfrierbehälter („*Freezing Container*“, Nalgene, Rochester, USA) bei -80°C gelagert und am nächsten Tag oder nach 2 bis 3 Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.4.4 Subkultivierung

Die in Kultur befindlichen Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz passagiert, d. h. subkultiviert, um eine Kontaktinhibition zu vermeiden. Zur Passagierung wurden die Zellen einer 80 cm²-Kulturflasche zunächst mit 10 ml PBS (37°C) gewaschen, dann mit 1 ml „*Trypsin-EDTA Solution*“ (1x) ca. 3 min lang bei 37°C inkubiert. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium gestoppt. Die Zellen wurden

durch mehrmaliges Hoch- und Herunterpipettieren gründlich resuspendiert. Je nach gewünschter Verdünnung wurde ein Teil der Zellsuspension auf neue Kulturgefäße für die fortlaufende Kultur oder zur Kryokonservierung verteilt. Sollten Versuche in Kulturschalen (z. B. 10 cm-Platten oder 6-Well-Platten; NUNC, Roskilde, Dänemark) stattfinden, wurde vor der Aussaat der Zellen die Zellzahl eines Aliquots mit Hilfe einer Neubauer-Kammer (Engelbrecht, Edermünde) bestimmt.

2.5 Transfektion von Säugetier-Zelllinien

2.5.1 Transiente Transfektion von Säugetierzellen mit dem „*FuGENE*[®]6

Transfection Reagent“ (Roche Diagnostics Corporation, Mannheim)

Etwa 2 h vor der Transfektion erhielten die Zellen neues Zellkulturmedium. „*FuGENE*[®]6 *Transfection Reagent*“ wurde in serumfreies Medium pipettiert und durch mehrmaliges, vorsichtiges Klopfen auf den Handballen gemischt. Nach Zugabe der Plasmid-DNA und vorsichtigem Mischen nach obiger Klopfmethode wurde der „*FuGENE*[®]6 *Transfection Reagent*“-DNA-Komplex (100 µl Gesamtvolumen) 35 bis 40 min lang bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise in das Kulturmedium des Kulturgefäßes mit den zu transfizierenden Zellen pipettiert.

2.5.2 Stabile Transfektion der Säugetier-Zelllinie NIH-3T3 durch transgene Retroviren

Prinzip

Retroviren transkribieren ihre RNA nach der Infektion der Wirtszelle mit Hilfe ihrer im Viruskapsid enthaltenen Reversen Transkriptase in DNA und integrieren diese dann ins Wirtsgenom. Daher werden sie zur stabilen Transfektion von Zelllinien eingesetzt. Im pWZL-System werden zur Virenherstellung sogenannte „Verpackungs-Zelllinien“ („*packaging cell lines*“) benutzt, die bereits einen Teil der Virushüllproteine synthetisieren. Nach Transfektion dieser Linien mit dem pWZL-neo-Plasmidkonstrukt werden die vollständigen Virionen gebildet, die zusammen mit dem Kulturmediumüberstand gewonnen werden. Das Plasmid pEGFP-C1 (Clontech Laboratories, Palo Alto, USA)

wird kotransfiziert, um unter dem Fluoreszenzmikroskop die Transfektionseffizienz anhand der Expression des „*Enhanced Green Fluorescent Protein*“ (EGFP) zu kontrollieren. Mit dem virenhaltigen Zellkulturmedium (Überstand) sind Nagetier-Zellen transfizierbar, die aufgrund der durch pWZL-neo vermittelten Neomycinresistenz selektioniert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Maus-Zelllinie NIH-3T3 stabil mittels Retroviren transfiziert, die die cDNA von DYRK1B-p65, DYRK1B-p69 bzw. DYRK1B-p75 enthielten.

Transfektion der „Verpackungs-Zelllinie“ Phoenix™ und Ernte der Retroviren

Die Transfektion der Phoenix™-Zellen erfolgte nach der Calciumphosphatpräzipitationsmethode (Graham & van der Eb, 1973). Am Tag vor der Transfektion wurde eine ca. 80% konfluente Zellpopulation im Verhältnis 1 : 8 mit Zellkulturmedium verdünnt und in 140 mm-Kulturschalen (NUNC, Roskilde, Dänemark) ausgesät. Vier Stunden vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Pro Kulturschale wurden 50 µg pWZL-neo-Konstrukt und 200 ng pEGFP-C1 zur Kontrolle der Transfektionseffizienz eingesetzt. Die DNA wurde mit 366 µl CaCl₂ [2 M] in einem 15 ml Polystyrolröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) gemischt und mit A. bidest. auf 3 ml aufgefüllt. Zu dem DNA-CaCl₂-Gemisch wurden 3 ml 2x HBS tropfenweise zugegeben. Anschließend wurde 25 s lang mittels Pipette mit Luft begast und zuletzt durch Pipettieren gründlich gemischt. Innerhalb von 20 min bildete sich ein Präzipitat, das als trübe Flüssigkeit in die entsprechende 140 mm-Platte getropft wurde. Am nächsten Tag erhielten die Zellen frisches Kulturmedium. Die Transfektionseffizienz wurde anhand der EGFP-Expression mikroskopisch kontrolliert. Da die Virionen bei 32°C stabiler als bei 37°C sein sollen, wurde ab dem 2. Tag nach der Transfektion die weitere Inkubation bei 32°C/5% CO₂ durchgeführt. Am 3. und 5. Tag nach der Transfektion wurde jeweils der virenhaltige Zellkulturüberstand abgenommen, über ein 0,45 µM-Filter gegeben, um eventuell im Überstand befindliche transfizierte Phoenix™-Zellen zu entfernen, und in sterilen Röhrchen bei -20°C gelagert. Die Platten mit den unterschiedlich transfizierten Phoenix™-Zellen wurden mit 20 ml 4°C-kaltem PBS gewaschen und einer denaturierenden Lyse in ca. 2 ml Lysepuffer unterzogen, um die Transfektionseffizienz im *Western blot* zu kontrollieren.

Infektion von NIH-3T3-Zellen mit Retroviren und Selektion mit Neomycin

NIH-3T3-Zellen wurden in fünf „6-Well-Multidish“-Platten (NUNC, Roskilde, Dänemark) so ausgesät, dass sie am Tag der Infektion eine Fläche von 30% - 40% bedeckten (Aussaat von 80.000 Zellen/Well am Vortag). Zur Infektion wurden 10 ml Retrovirensuspension und 5 ml Normalmedium (10% FCS, 1% „Penicillin/Streptomycin Solution“) mit 15 µl „PolybreneTM“-Stammlösung [5 mg/ml A. bidest.] gemischt. Mit dieser Mischung wurden die Zellen in den Wells Nr. 1 bis 5 der entsprechenden Platte nach Entfernung des Zellkulturmediums überschichtet. Well Nr. 6 diente als Negativkontrolle und wurde mit 3 ml virusfreiem Zellkulturmedium bedeckt. Am nächsten Tag wurden die Zellen erneut transfiziert. Die Inkubation der Zellen mit den virushaltigen Überständen erfolgte bei 32°C und 5% CO₂. Zur Selektion der infizierten Zellen wurden die Zellen 10 Tage lang mit 2 mg/ml Neomycin behandelt, bis in dem Well der Negativkontrolle keine lebenden Zellen mehr mikroskopisch detektierbar waren. Die stabil transfizierten, Neomycin-resistenten Zellen wurden subkultiviert und zur weiteren Lagerung in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Zur Subkultivierung wurden die Zellen jedes Wells mit 2 ml PBS (37°C) gewaschen, ca. 15 min lang mit 200 µl „Trypsin-EDTA Solution“ (1x) inkubiert und in 2 ml Neomycin-haltigem Zellkulturmedium (2 mg/ml Neomycin) gründlich gemischt. Mit Zellkulturmedium wurde eine 20 ml-Zellsuspension hergestellt, die auf zwei Zellkulturflaschen aufgeteilt wurde, nachdem je transfizierter Zelllinie 500 µl Zellsuspension abgezweigt und 30 s lang bei 14.000 rpm/RT („Sigma 1-13“, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode/Harz) pelletiert wurden. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen, mit 40 µl 2x LSB/DTT gemischt und nach einer 5-minütigen 96°C-Denaturierung bei -20°C gelagert, um später die Transfektionseffizienz im *Western blot* zu kontrollieren.

2.6 Isolierung von Proteinen aus Säugetierzelllinien

2.6.1 Kernextrakte

Die Extraktion der Kernproteine aus Säugetier-Zelllinien erfolgte weitgehend wie in der Primärliteratur beschrieben (Sadowski & Gilman, 1993). Dazu wurden die nahezu konfluent gewachsenen Zellen auf Eis nach folgendem Schema gewaschen: 1x mit

kaltem PBS, 1x mit PBS + V + F und 1x mit Hypotonischem Puffer (mit Zusätzen). Die Zellen wurden daraufhin in 500 µl Hypotonischem Puffer (mit Zusätzen) + NP-40 abgeschabt und in kalte Mikroreaktionsgefäße überführt. Die Überstände mit Membranen und Cytosol wurden nach Zentrifugation (20 s/14.000 rpm/4 °C, Eppendorf-Tischzentrifuge „5417R“) abgenommen und bei -80 °C zwecks späterer Kontrolle im *Western blot* gelagert. Das *Pellet* mit Zellkernen wurde in 150 µl (oder weniger) Hochsalz-Puffer (mit Zusätzen) resuspendiert und 30 min lang bei 4 °C im Überkopfrotator („Reax 2“, Heidolph, Schwabach) inkubiert. Durch den Hochsalz-Puffer (mit Zusätzen) wurden die Kerne aufgeschlossen und die Kernproteine in Lösung gebracht. Unerwünschte Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (20 min/12.000 rpm/4 °C, Eppendorf-Tischzentrifuge „5417R“) als *Pellet* entfernt. Der Überstand, der den Kernextrakt darstellt, wurde in kalten Mikroreaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.6.2 Denaturierende Lyse („SDS-Lyse“)

Denaturierende Lysebedingungen verhindern Dephosphorylierung durch Phosphatasen sowie eine nachträgliche Phosphorylierung durch Kinasen im Lysat. Zur Expressionsanalyse von DYRK1B und DYRK1A in verschiedenen Zelllinien wurde die Zellkulturplatte nach Entfernung des Zellkulturmediums mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden auf Eis mit 1 ml (10 cm-Platte), 0,5 ml (6 cm-Platte) bzw. 200 µl (6-Well) kochendem Lysepuffer für denaturierende Lyse benetzt, abgeschabt und in einem Mikroreaktionsgefäß 5 min lang im Wasserbad gekocht. Anschließend wurde das Lysat 30 s lang mit Ultraschall (ca. 60% *Output*, „Sonifier 450“, Branson Ultrasonics, Danbury, USA) behandelt und nach Entfernung unlöslicher Bestandteile mittels Zentrifugation (ca. 2 min/Höchstgeschwindigkeit/RT, „Sigma 112“, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode/Harz) bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.6.3 Native Lyse

Säugetierzellen in 6 cm- bzw. 10 cm-Platten (NUNC, Roskilde, Dänemark), die z. T. transient transfiziert worden waren, wurden vor einer Immunpräzipitation mit an-

schließendem Immunkomplex-Kinase-Assay nativ lysiert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen 2-mal mit kaltem PBS + V gewaschen und schließlich in 0,5 ml bzw. 1 ml Lysepuffer für native Lyse nach 5 min Inkubation auf Eis abgeschabt. Die Zellsuspension wurde in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und 3-mal 15 s lang mit Ultraschall (ca. 60% *Output*, „*Sonifier 450*“, Branson Ultrasonics, Danbury, USA) behandelt. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (10 min/14.000 rpm/4°C, Eppendorf-Tischzentrifuge „5417R“) abgetrennt. Der Überstand stellte das native Lysat dar.

2.7 Immunpräzipitation

Nach der nativen Lyse wurde das Lysat (mindestens 250 µg Gesamtprotein) mit 1 µl DYRK1B-Präimmunserum (Kaninchen 8228, letzte Blutung, 2000) bzw. mit 1 µl DYRK1B-Antiserum (Kaninchen 8228, letzte Blutung, 2000) versetzt und nach kurzem Vortexen 1 bis 1,5 h lang auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die entsprechenden Immunkomplexe an 30 µl ProteinA-Sepharose[®] über Nacht im Überkopfrotator (Stufe 2,5) bei 4°C gebunden. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation (14.000 rpm/4°C, Eppendorf-Tischzentrifuge „5417R“) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Sepharose-Immunkomplex-*Pellet* wurde zweimal mit 1 ml kaltem Waschpuffer mit 0,1% (w/v) NP-40 und zweimal mit Waschpuffer ohne NP-40 gewaschen, d. h. 1 min bei 14.000 rpm/4°C (s. o.) abzentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig abgehoben. Die an die Sepharose gebundene Proteinkinase DYRK1B wurde in einem Kinase-Assay eingesetzt.

2.8 Kinase-Assay

Die katalytische Aktivität von DYRK1B wurde anhand einer *in vitro*-Phosphorylierung des synthetischen Peptids DYRKtide (RRRFRPAS↓PLRGPPK) bestimmt, einem optimierten Substrat von DYRK1A (Himpel *et al.*, 2000).

Nach der oben beschriebenen Immunpräzipitation wurden 15 µl Substratmix (zuvor 5 min lang bei 30°C in einem Heizblock vorgewärmt) auf das Sepharose-*Pellet* pipettiert. Nach 5-sekündigem Vortexen und 10-sekündiger Zentrifugation (14.000

rpm/RT, „Sigma 1-13“, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode/Harz) wurde der Reaktionsansatz 10 min lang bei 30°C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde abgestoppt, indem 3x 4 µl jedes Ansatzes auf Anionenaustauscherpapier („Whatman DE81“, Maidstone, UK) pipettiert und die Ansätze entweder bei -20°C zwecks späterer Kontrolle im *Western blot* eingefroren oder direkt denaturiert wurden. Das Papier wurde 7x in 5% Phosphorsäure gewaschen (1x 15 min, 5x 10 min, 1x 15 min). Nach kurzen Waschungen in A. bidest. bzw. Ethanol 70% (v/v) wurden die Anionenaustauscherpapiere 25 min lang bei 60°C getrocknet (Trockenschrank), bevor der Einbau von ³²P in DYRKtide in flüssigem Szintillationscocktail („Ready Protein⁺™ Liquid Scintillation Cocktail“, Beckman Instruments, Fullerton, USA) im Beta-Counter („LS6000SC“, Beckman, Fullerton, USA) gemessen wurde (Himpel *et al.*, 2000). Die Reaktionsansätze (*Pellets*) wurden in 25 µl 0,5x LSB/DTT denaturiert (5 min/95°C). Die Reaktionsprodukte wurden in einem 8%-SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels *Western blot* auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran®, Schleicher & Schuell, Dassel) transferiert. Nach Ponceau S-Färbung und Entfärbung durch 2x 10 min 1x TBS wurde die Membran ca. 25 min lang bei 68°C im Trockenschrank getrocknet und mit Transparentfolie bedeckt. Die radioaktiven Signale wurden am folgenden Tag auf einem über Nacht auf der Membran exponierten Phosphor-Screen („Cyclone™ Storage Phosphor Screen“, Packard, Meriden, USA) mit Hilfe des Phosphoimagers („Storm™ 820“, Amersham Biosciences, Freiburg) in Form eines Autoradiogramms detektiert. Anschließend wurde die Membran 2x in 1x TBS gewaschen und über Nacht bei 4°C (Kühlschrank im Isotopenlabor) in 3% BSA/1x TBS inkubiert (*Blocking*). Am nächsten Tag wurde die *Western blot*-Membran 1 h lang bei RT mit DYRK1B-Antiserum (C-Terminus; s. S. 57) inkubiert und 2x 10 min lang mit Waschpuffer für DYRK1B-*Western blots* gewaschen. Nach 2x 10 min Absättigung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen durch 5% Magermilch/1x TBST erfolgte eine einstündige Inkubation der Membran mit sekundärem Anti-Kaninchen-IgG-POD-Antikörper („ImmunoPure® Goat Anti-Rabbit IgG, Fc Fragment Specific, Peroxidase Conjugated“, Pierce, Rockford, USA), der 1 : 5.000 mit 5% Magermilch/1x TBST verdünnt wurde. Nach viermaliger Waschung des *Blots* mit 1x TBST (jeweils 15 bzw. 30 min lang) wurden die immunpräzipitierten DYRK1B-Spleißvarianten bzw. GFP-DYRK1B-p69 mittels Peroxidase-vermittelter Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm detektiert (s. S. 59).

2.9 DNA-Retardierungs-Assay (EMSA)

Zur Untersuchung der Bindungsfähigkeit des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP Response Element Binding Protein*) an *DYRK1A*-Promotor A wurden DNA-Retardierungs-Assays (*Electrophoretic Mobility Shift Assays*, EMSAs) mit Kernextrakten aus unstimulierten oder ca. 30 min lang mit Forskolin [10 µM] stimulierten und zuvor einen Tag lang serumfrei bzw. serumhaltig gewachsenen PC-12-Zellen durchgeführt. Die Kernextrakte wurden mit ³²P-markierten, doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden inkubiert, die die CREB-Konsensussequenz (*cAMP Response Element*, CRE) **5'-TGACGTCA-3'**, mutiertes CRE **5'-TG~~T~~GGTCA-3'** oder das CRE-Motiv aus *DYRK1A*-Promotor A enthielten (Tab. 2.7), und anschließend auf ein Polyacrylamid (PAA)-Gel aufgetragen. Die Sequenz des Oligonukleotides mit CRE stammt von Promega (Madison, USA), die Sequenz des Oligonukleotides mit mutiertem CRE von Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden).

Tab. 2.7: Liste der in EMSAs genutzten Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'
APr_D1A_BM_for	GGCGGGAGGAG GACGTC AGCACGTCAG
APr_D1A_BM_rev	CTGACGTGCTGACGTCCTCCTCCCGCC
CRE_BM_for	AGAGATTGCCT GACGTC AGAGAGCTAG
CRE_BM_rev	CTAGCTCTCTGACGTCAGGCAATCTCT
CREmut_BM_for	CAGGTAGATCT TGTGGTCA AGAGATGGC
CREmut_BM_rev	GCCATCTCTTGACCACAGATCTACCTG

Die Oligonukleotide wurden nach der „*End labeling*“-Methode markiert. Sie sind so konstruiert, dass sie zu Doppelsträngen mit glatten Enden hybridisieren (ohne Überhänge). Vor dem Retardierungsversuch wurden zunächst die zueinander gehörenden einzelsträngigen DNA-Oligonukleotide zu doppelsträngigen Oligonukleotiden hybridisiert und radioaktiv markiert. Dazu wurden je 30 µl einer wässrigen 2 pmol/µl-Verdünnung gemischt und 2 min lang in einem Heizblock („Thermomixer compact“, Eppendorf, Hamburg) bei 95 °C inkubiert. Nach Abschalten des Heizblocks wurden die Oligonukleotide bei einer somit kontinuierlich bis auf RT abnehmenden Tempe-

ratur inkubiert (Endvolumen: 60 µl, Endkonzentration: 1 pmol/µl). Ca. 10 pmol Oligonukleotid wurden mit „10x Buffer A“ (für Polynukleotidkinase), 90 µCi [γ - 32 P]-ATP und 10 u T4-Polynukleotidkinase (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) in einem Endvolumen von 20 µl ÜN bei RT inkubiert. Die markierten Fragmente wurden mit dem „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und jeweils in 50 µl A. bidest. eluiert. Das 4,5% PAA/Glycerin-Gel für EMSA wurde bei 175 V einem einstündigen Vorlauf in 0,25x TBE unterzogen, um das ungebundene APS herauslaufen zu lassen. Zur Bindung von CREB wurden 9,5 µl Kernextrakt, der zuvor mit kaltem A. bidest. 1 : 3 verdünnt wurde, mit 9,5 µl EMSA-Cocktail versetzt und 5 min lang bei RT inkubiert. Um die Spezifität der CREB/DNA-Bindung zu untersuchen, wurde diese Mischung mit unmarkiertem („kaltem“) Oligonukleotid im 10-fach oder 100-fach molaren Überschuss inkubiert.

Im elektrischen Feld (Elektrophorese) wandern die markierten DNA-Oligonukleotide zur Anode. Ihre Laufgeschwindigkeit ist jedoch verzögert (retardiert), wenn ein Protein daran bindet, was im Autoradiogramm zu erkennbaren Banden führt. Ein *Supershift* der retardierten Bande entsteht durch spezifische Bindung eines Antikörpers an das Protein im Protein/DNA-Komplex (Abb. 2.7).

9,5 µl Kernextrakt (zuvor mit kaltem A. bidest. 1 : 3 verdünnt) aus Forskolin-stimulierten PC-12-Zellen (CREB-Phosphorylierung) wurden mit 9,5 µl EMSA-Cocktail und polyklonalem P-CREB-spezifischen Antikörper (2 µl; Upstate, Charlottesville, USA) oder polyklonalem E2F1-spezifischen Antikörper als Negativkontrolle (3 µl; Active Motif, Rixensart, Belgien) versetzt und 5 h lang bei 4 °C im Überkopfröhrator „Reax 2“ (Heidolph, Schwabach) inkubiert. Nach Zugabe des Ansatzes zu 1 µl (40.000 cpm, entsprach ca. 0,1 bis 0,3 ng) radioaktiver Oligonukleotid-DNA wurde das Gemisch nochmals ca. 20 min lang bei RT inkubiert und mehrere Stunden lang im 4,5% PAA/Glycerin-Gel für EMSA aufgetrennt. Die farbigen Banden der „6x Loading Dye Solution“ (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) in zwei separaten Gelspuren dienten zur Kontrolle der DNA-Laufstrecke während der Elektrophorese.

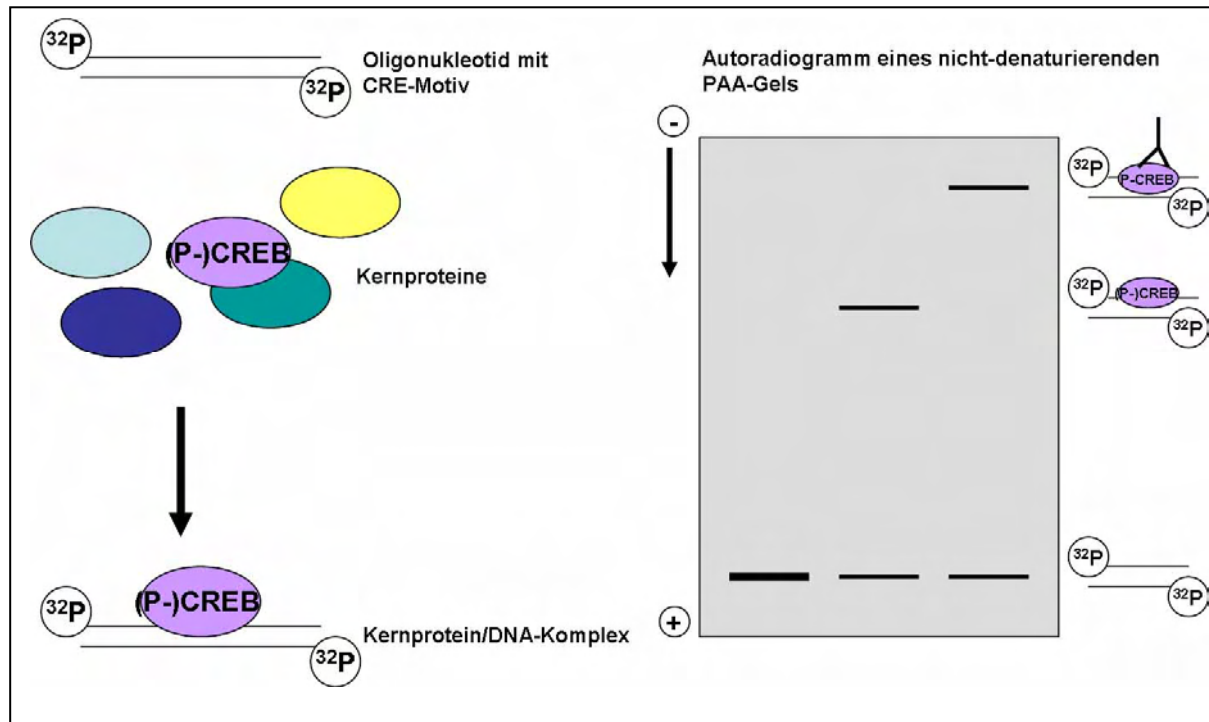


Abb. 2.7: Schema eines EMSAs am Beispiel von CREB

In der ersten Spur des Autoradiogramms befindet sich nur freies, radioaktiv markiertes, doppelsträngiges Oligonukleotid, wohingegen Spur 2 die durch (P-)CREB⁴-Bindung retardierte DNA-Bande und Spur 3 die durch Phospho-CREB/Antikörper-Bindung (*Supershift*) noch stärker retardierte DNA-Bande zeigen.

Nach dem Gellauf (ca. 3,5 h bei 175 V in 0,25x TBE) wurde das Gel 20 min lang bei RT in Fixierpuffer (10% Methanol, 10% Essigsäure, A. bidest.) inkubiert und anschließend auf einem dünnen Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel) unter Transparentfolie ca. 1 h lang bei ca. 63 °C auf dem Geltrockner (Biometra, Göttingen) getrocknet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Phosphoimagers („StormTM 820“, Amersham Biosciences, Freiburg) nach ein- oder mehrtägiger Exposition eines Phosphor-Screens („Imaging Plate BAS-MS 2325“, Fuji Photo Film, Kanagawa, Japan).

⁴ phosphoryliertes bzw. unphosphoryliertes CREB

2.10 Reportergen-Assay, Gesamtproteinbestimmung und Beta-Galaktosidase-Assay

2.10.1 Reportergen-Assay

Um die 5'-flankierenden Sequenzbereiche von Exon 1 bzw. Exon 2 (Guimerà *et al.*, 1999) des *DYRK1A*-Gens auf Promotoraktivität zu untersuchen, wurden die besagten cDNA-Fragmente in den Vektor pGL3-Basic (Promega, Madison, USA) *upstream* einer cDNA (Reportergen) kloniert, die das Enzym *Firefly (Photinus pyralis)*-Luciferase kodiert. Nach transienter Transfektion diverser eukaryotischer Zelllinien mit diesen Konstrukten wurde das exprimierte Reportergen durch den Umsatz des Substrates Luciferin im Röhren-Luminometer („Lumat LB 9507“, EG&G Berthold, Bad Wildbad) quantifiziert. Je höher die gemessene Luciferase-Aktivität ist, desto größer ist die Promotoraktivität des zu untersuchenden DNA-Bereiches. Es handelt sich um eine schnelle und sensitive Methode. Zum Einsatz kamen das „*Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer*“ (Promega, Madison, USA) oder das „*Dual-Luciferase® Reporter Assay System*“ (Promega). Bei Einsatz des erstgenannten Systems wurden die in 6-*Wells* wachsenden Zellen 1 oder 2 Tage nach der Transfektion (eventuelle Behandlung mit Chemikalien s. Ergebnisteil) 1x oder 2x mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl „*Reporter Lysis Buffer*“ (1x) lysiert, indem sie 5 min lang auf Eis schüttelnd inkubiert wurden. Die Zellen wurden abgeschabt und im Mikroreaktionsgefäß 2x 10 s lang gevortext. Nach Zentrifugation (1 min/14.000 rpm/4 °C, Eppendorf-Tischzentrifuge „5417R“) wurden die Überstände (Lysate) auf Eis gelagert und u. a. im Reportergen-Assay eingesetzt. Bei der zweiten Methode, die für eine zusätzliche Messung eines weiteren Reportergens zwecks Bestimmung der Transfektionseffizienz konzipiert ist, wurden die transfizierten Zellen 1x mit PBS (RT) gewaschen und mit 250 µl „*Passive Lysis Buffer*“ (PLB; minimale Hintergrundlumineszenz) sofort lysiert und abgeschabt (aktive Lyse). Die homogenisierte Zellsuspension wurde in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (30 s/14.000 rpm/4 °C). Von diesen Lysaten wurden 4 µl zu 20 µl „*Luciferase Assay Reagent II*“ (LAR II, enthält u. a. Luciferin) gegeben und durch Hoch- und Herunterpipettieren gemischt, bevor sie einer 10-sekündigen Messung im Röhren-Luminometer (s. o.) unterzogen wurden. Die Lysate, die mit Hilfe des „*Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer*“-Kits generiert wurden, wurden

mit dem „*Luciferase Assay Substrate*“ anstatt mit LAR II inkubiert, wobei auch hier Licht (gemessen als Relative Luciferase-Einheiten, RLU) emittiert wurde. Die Luciferase-Aktivität wurde durch Normierung von RLU auf Gesamtprotein (s. u.) und/oder auf Beta-Galaktosidase (Beta-Galaktosidase-Assay, Transfektionseffizienz, s. S. 49) erhalten.

Das Promotorkonstrukt der Glukose-6-Phosphatase wurde unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von Herrn Dr. Dieter Schmoll (Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität Greifswald) zur Verfügung gestellt.

2.10.2 Gesamtproteinbestimmung

Um die Relativen Luciferase-Einheiten (RLU) von Zelllysaten für Reporter-Gen-Assays auf Gesamtprotein zu normieren oder um ein SDS-Polyacrylamidgel nach Gesamtproteinangleich der einzelnen Lysate gleichmäßig beladen zu können, wurde eine Gesamtproteinbestimmung mit Hilfe des „*BCA Protein Assay Reagent Kits*“ durchgeführt (PIERCE, Rockford, USA). Diese Methode kombiniert die Biuret-Reaktion (Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} durch Protein in alkalischem Milieu) mit der hochsensitiven und selektiven kolorimetrischen Detektion von Cu^{+} infolge Chelatisierung durch Bicinchonsäure (BCA). Der wasserlösliche, purpurfarbene Komplex weist eine starke Absorption bei $\lambda = 562 \text{ nm}$ auf. Diese erlaubt eine zuverlässige Quantifizierung von Gesamtprotein mit $c = 0,02$ bis 2 mg/ml (fast lineare Konzentrations-(OD-Blank)-Kurve des BSA-Standards). In je zwei *Wells* einer 96-*Well*-Mikrotiterplatte, deren Kavitäten im unteren Bereich abgerundet sind (Greiner-Bio One, Frickenhausen), wurden $5 \mu\text{l}$ Lysat bzw. Leerwert (Lysepuffer) bzw. Negativkontrolle (A. bidest.) bzw. BSA-Stammlösung mit $100 \mu\text{l}$ Reaktionsmix (50 Teile Reagenz A, 1 Teil Reagenz B) 30 min lang bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Absorption als OD bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ im Mikrotiterplattenleser („Lambda E“, MWG, Ebersheim) gemessen. Nach Subtraktion des gemittelten Leerwertes von den einzelnen OD-Werten wurden die Mittelwerte aus den erhaltenen (OD - Leerwert-)Werten berechnet. Diese Mittelwerte dienten zur Normierung im Reporter-Gen-Assay (Ähnlichkeit der Mittelwerte als Kriterium für eine gleichmäßige Lyse der Zellen in allen *Wells*) oder zum Angleich der Gesamtproteinmengen der Lysate für die SDS-PAGE.

$$\text{Luciferase-Aktivität} = \frac{\text{Wert des Luminometers (RLU)}}{\text{Gesamtprotein ((OD - Leerwert)-Mittelwert)}}$$

Zur Signifikanzbestimmung von Verhältnissen (*ratios*) von Luciferase-Aktivitäten zueinander wurde mit Hilfe der SEM und der Freiheitsgrade ($n - 1$) der gepaarte, zweiseitige t-Test (Colton, 1974) durchgeführt, falls $n \geq 3$. Dazu wurde dem t-Wert ($((ratio - 1)/SEM)$) mit Hilfe einer Tabelle (Colton, 1974) der entsprechende p-Wert (Signifikanz) zugeordnet.

2.10.3 Beta-Galaktosidase-Assay

Neben den Promotorkonstrukten wurde zur Überprüfung der Transfektionseffizienz oft der Expressionsvektor pSV- β -Galactosidase (Promega, Madison, USA) kotransfiziert, welcher eine cDNA enthält, die das bakterielle Enzym Beta-Galaktosidase kodiert. Dieses Enzym spaltet vom in der „*Reaction Buffer Mixture*“ des „*Luminescent β -galactosidase Detection Kit II*“ (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA) enthaltenen Substrat Galacton-Star einen Galaktosidrest ab, sodass ein Dioxetan-Anion entsteht, dessen weiterer Abbau mit Lichtemission einhergeht (Bronstein *et al.*, 1989). Diese wird binnen 5 s im Röhren-Luminometer („Lumat LB 9507“, EG&G Berthold, Bad Wildbad) gemessen, nachdem 4 μ l Lysat mit 40 μ l „*Reaction Buffer Mixture*“ 1 h lang bei RT in einem Luminometer-Röhren (Sarstedt, Nümbrecht) inkubiert worden waren. Je größer die Aktivität der exogenen, als interner Standard dienenden Beta-Galaktosidase, desto mehr Lichtemission, desto höher die Transfektionseffizienz. Im Gegensatz zur Aktivität dieses internen Standards wird die Aktivität der eukaryotischen (endogenen) Beta-Galaktosidase durch den speziell formulierten „*Reaction Buffer*“ unterdrückt.

$$\text{Luciferase-Aktivität} = \frac{\text{Wert des Luminometers (RLU)}}{\text{Beta-Galaktosidase-Aktivität}}$$

2.11 Northern blot und Arrays

2.11.1 Northern blot

Beim *Northern blot* wird Gesamt-RNA, die zuvor mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt wurde, auf eine Nylonmembran transferiert und fixiert. Mit einer spezifischen, radioaktiv markierten cDNA-Sonde lässt sich eine bestimmte mRNA als Bande auf einem Phosphor-Screen nachweisen, deren Signalstärke mit dem mRNA-Gehalt korreliert.

Von der zu untersuchenden Gesamt-RNA wurden 15 µg nach einer ethanolischen Fällung (-80°C, ÜN), Pelletierung (1 h/14.000 rpm/4°C) und Denaturierung (ca. 1 h/ ca. 400 rpm/63°C, „*Thermomixer compact*“, Eppendorf, Hamburg) in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Das anschließend auf dem UV-Tisch („FLUO_LINK“, Biometra, Göttingen) mit der Kamera „Herolab E.A.S.Y 429 K“ (Herolab, Wiesloch) aufgenommene Gelfoto (Ethidiumbromidfärbung) diente als Ladungskontrolle. Die Übertragung der RNA auf die Nylonmembran „*HybondTM-N+*“ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) erfolgte durch Kapillar-*Blot*-Technik mit 10x SSC als *Blotting*-Puffer. Nach dem Transfer ÜN wurde die Nylonmembran auf dickem Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel) angetrocknet, während die beiden durch Ethidiumbromid angefärbten 18 S und 28 S rRNAs (Ratte: 1.874 bp bzw. 4.718 bp, Mensch: 1.868 bp bzw. 5.025 bp; erkennbar an der orangen Färbung durch interkaliertes Ethidiumbromid) als Größenmarker mit einem Kugelschreiber eingezeichnet wurden. Die Membran wurde 5 min lang in 2x SSC geschwenkt und nochmals auf dickem Filterpapier an der Luft angetrocknet, bevor die RNA mittels UV-Licht (0,4 J/cm², λ = 312 nm, „FLUO_LINK“, Biometra, Göttingen) kovalent und irreversibel an die Membran gebunden wurde. Anschließend wurden auf der Membran befindliche Salze durch 5-minütiges Schütteln in A. bidest. entfernt. Die Membran wurde an der Luft getrocknet und bis zur Hybridisierung trocken und lichtgeschützt zwischen zwei dicken Filterpapieren aufbewahrt.

2.11.2 Radioaktive Markierung von cDNA-Sonden mit ³²P

Bei der *DYRK1A*-Sonde handelte es sich um eine *HA-hDYRK1A*-cDNA von Frau Mónica Álvarez (Centre de Regulació Genòmica-CRG, Barcelona, Spanien), die mit

EcoRI verdaut und durch Agarosegelelektrophorese/Gelextraktion gereinigt wurde (Datenbank-Zugangsnummer NM_001396, *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen am 5'-Ende und ca. 1.475 bp *downstream*). Die *rGAPDH*-Sonde (ca. 1.400 bp) und die *hDHFR*-Sonde (ca. 700 bp, RZPD, IMAG p958MO43025Q2) wurden mir freundlicherweise von Herrn Dr. Paul Hekerman zur Verfügung gestellt.

Die radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten mit [α -³²P]-dCTP erfolgte nach dem Verfahren des „*Random primed labeling*“ (Feinberg & Vogelstein, 1983). 35 bis 50 ng cDNA wurden mit 0,4 bis 1,0 µg Hexanukleotid-*Primer* (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) gemischt. Die DNA wurde 10 min lang bei 100°C im Wasserkocher oder bei 98°C im „Thermomixer“ denaturiert, 5 bis 10 min lang auf Eis inkubiert und abzentrifugiert („Sigma 112“, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode/Harz). Nach Zugabe von ca. 40 - 70 µCi [α -³²P]-dCTP, 5 u „*Klenow-Fragment, exo⁻*“ (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) und 1x OLB für dCTP erfolgte nach kurzem Vortexen die Synthese des neuen, komplementären cDNA-Stranges ÜN bei RT. Anschließend wurde die markierte cDNA mit Hilfe des „*Nucleotide Removal Kits*“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und mit 200 µl „*EB*“-Puffer von der Säule eluiert. Die Markierungseffizienz wurde durch Messung eines 1 µl-Aliquots im *Beta-Counter* („LS6000SC“, Beckman, Fullerton, USA) bestimmt. Laut Herstellerangaben sollte die Sonde für die *Array*-Hybridisierung eine Gesamtaktivität von 10 bis 20 x 10⁶ cpm besitzen. Dieses Kriterium wurde erfüllt.

2.11.3 Hybridisierung und Waschung von *Arrays* und *Northern blots*

„*Cancer Profiling Array I*“ und „*Cancer Cell Line Profiling Array*“

(BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA):

Der „*Cancer Profiling Array I*“ beinhaltet neben Positivkontrollen (humane Krebszelllinien) und Negativkontrollen (z. B. *E. coli*-DNA) 241 cDNA-Paare aus Gesamt-RNA verschiedener humaner Gewebetypen, wobei jedes Paar die cDNAs aus Tumorgewebe (T) und aus normalem Gewebe (N) eines einzelnen Patienten repräsentiert. Die Normierung seitens des Herstellers erfolgte gegen vier *Housekeeping*-Gene.

Auf dem „*Cancer Cell Line Profiling Array*“ befinden sich neben den Negativkontrollen (z. B. *E. coli*-DNA) und Ubiquitin-cDNA die gegen zwei *Housekeeping*-Gene nor-

mierten Gesamt-cDNAs 26 verschiedener humaner Tumorzelllinien, von denen jede Linie wiederum zuvor 26 unterschiedlichen Behandlungen unterzogen wurde: Hitzeschock, UV- oder Gamma-Strahlung, oxidativem Stress (Wasserstoffperoxid), Serumarmut (0,5% FCS) oder Chemotherapeutika (z. B. 5-Fluorouracil). In der zweiten Spalte wurde jeweils die Kontroll-Gesamt-cDNA der entsprechenden unbehandelten Zelllinie aufgetragen. Die 48 h-Dosis des jeweiligen Chemotherapeutikums bzw. die Zeit des Hitzeschocks (44°C) oder der UV-Strahlung, die eine 50%-ige Wachstumshemmung (IC₅₀) bewirkt, wurde vom Hersteller in einem MTT-Assay für jede Zelllinie ermittelt und angewendet.

Die mit A. bidest. angefeuchteten Arrays wurden ca. 1 h („*Cancer Profiling Array I*“) bzw. 0,5 h („*Cancer Cell Line Profiling Array*“) lang bei 68°C im Hybridisierungssofen („*Shake 'n' Stack*“, Thermo Hybaid, Ashford, UK) auf einer Gaze in einer sich drehenden Röhre (Biometra, Göttingen) mit 10 bzw. 5 ml „*BD ExpressHyb Hybridization Solution*“/0,01% (w/v) DNA („*MB grade*“) aus Fischsperma (bereits geschert und denaturiert) prähybridisiert. Die cDNA-Sonde wurde mit 100 bis 150 µg DNA aus Fischsperma (s. o.) gemischt, die zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran diente, 5 min lang im Wasserkocher aufgeköcht und 2 bis 4 min lang auf Eis inkubiert, bevor die Array-Membranen damit in 5 bis 6 ml „*BD ExpressHyb Hybridization Solution*“/0,01% (w/v) DNA („*MB grade*“) aus Fischsperma (s. o.) ÜN bei 68°C (bzw. 42 °C bei *GAPDH*-Sonde auf „*Cancer Profiling Array I*“) im Hybridisierungssofen (s. o.) hybridisiert wurden (ca. 3×10^6 cpm/ml Hybridisierungslösung). Die Arrays wurden nach Entnahme der Hybridisierungslösung bei 68°C in der Röhre 30 min lang mit 12 bzw. 15 ml Waschlösung 1 (2x SSC/0,5% SDS (w/v)) sowie 1 h bzw. 30 min lang und erneut 30 min lang mit ca. 100 ml Waschlösung 1 gewaschen. Es folgte eine 30-minütige Waschung mit Waschlösung 1 bei 60 bzw. 50°C in einer Metallschale im schüttelnden Wasserbad („*SW-21C*“, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach) und eine 30-minütige Waschung mit Waschlösung 2 (0,2x SSC/0,5% SDS (w/v)) unter denselben Bedingungen. Anschließend wurde die Membran 5 min lang bei RT in 2x SSC geschüttelt, um SDS-Reste zu entfernen. Bei einer mit dem Geigerzähler („*LB 1210 B*“, Berthold) gemessenen Aktivität der Membran von ca. 10 s^{-1} wurde sie in Transparentfolie gelegt und mit Klebeband in einer Röntgenkassette befestigt, bevor ein Phosphor-Screen („*CycloneTM Storage Phosphor Screen*“, Packard, Meriden, USA bzw. „*Imaging Plate BAS-MS 2325*“, Fuji Photo

Film, Japan) aufgelegt wurde (RT), der nach einigen Tagen mit dem Phosphoimager (s. o.) gescannt wurde.

Northern blots:

Die mit A. bidest. angefeuchtete *Northern blot*-Membran wurde mit 12 ml *Northern blot*-(Prä-)Hybridisierungspuffer auf einer Gaze in einer Röhre (Biometra, Göttingen) ca. 4,5 h bei 42°C im Hybridisierungssofen („*Shake ´n´ Stack*“, Thermo Hybaid, Ashford, UK) prähybridisiert. Die cDNA-Sonde wurde 10 min lang im Wasserkocher aufgekocht und nach zehnminütiger Inkubation auf Eis mit 11 ml *Northern blot*-(Prä-)Hybridisierungspuffer gemischt. Nach Entnahme von etwa 11 ml der Prähybridisierungslösung aus der Röhre erfolgte die Hybridisierung der cDNA-Sonde mit der entsprechenden mRNA in einem Endvolumen von ca. 12 ml bei 42°C ÜN im Hybridisierungssofen (s. o.). Der *Northern blot* wurde nach Entnahme der Hybridisierungslösung ca. 10 min lang mit 15 ml 2x SSC/0,1% SDS (w/v) bei 42°C in der Röhre gewaschen. Daran schlossen sich zwei 20-minütige Waschungen mit 0,8x SSC/0,1% SDS (w/v) bei 55°C in einer Metallschale im schüttelnden Wasserbad an. Nach einer 20-minütigen Waschung mit 0,3x SSC/0,1% SDS (w/v) unter denselben Bedingungen wurde die Membran bei einer mit dem Geigerzähler („LB 1210 B“, Berthold) gemessenen Aktivität von ca. 10 s^{-1} in Transparentfolie gelegt und mit Klebeband in einer Röntgenkassette fixiert. Ein Phosphor-Screen (s. o.) wurde bei RT einige Tage lang bis zur Detektion mit Hilfe des Phosphoimagers (s. o.) auf der Membran exponiert.

2.11.4 Quantitative Auswertung von *Northern blot*-Hybridisierungen

Die elektronische Auswertung der *Northern blot*-Hybridisierungen wurde mit Hilfe der Software „*AIDA Advanced Image Data Analyzer*“ (Raytest, Straubenhardt) durchgeführt. Die Signalstärke jeder Bande wurde über die Fläche integriert. Nachdem automatisch von diesen Werten die Hintergrundwerte (Intensitäten der ober- und unterhalb einer Bande gelegenen Bereiche) subtrahiert worden waren, wurden die so bestimmten mRNA-Mengen auf den Mittelwert der mRNA-Mengen der unbehandel-

ten Zellen bezogen und im Diagramm semilogarithmisch gegen die Dauer der Aktinomycin D-Behandlung aufgetragen.

2.12 RNA-Interferenz

Zur selektiven Hemmung der Genexpression von *TP53*⁵ wurden doppelsträngige RNA-Moleküle (siRNA, „short interfering RNA“) in HeLa-Zellen (*TP53* +/+) eingebracht. Hierzu wurde das „*SignalSilence*TM p53 siRNA Kit (Human Specific)“ (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) benutzt (Abb. 2.8). Zur Visualisierung der Transfektionseffizienz mittels Fluoreszenzmikroskopie und zum Nachweis der Spezifität der *TP53*-siRNA wurden Zellen in separaten *Wells* mit Fluorescein-konjugierter „*SignalSilence*TM Control siRNA“ transfiziert, einer nicht-zielgerichteten, doppelsträngigen RNA (Negativkontrolle).

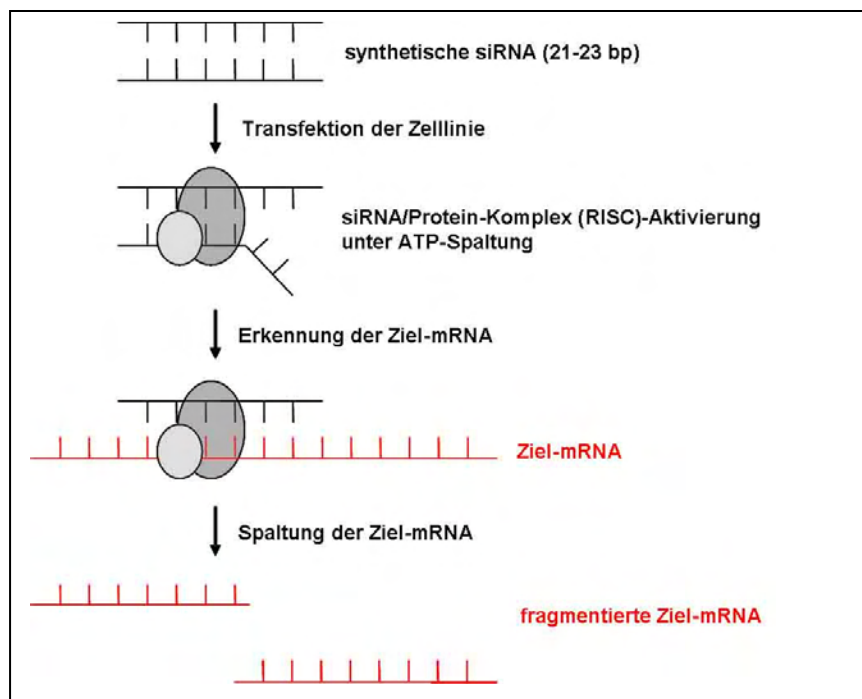


Abb. 2.8: Schema der RNA-Interferenz

RISC: *RNA-Induced Silencing Complex*.

⁵ Gen, das p53 kodiert

Es wurden 80.000 bzw. 100.000 HeLa-Zellen/ml Normalmedium nach Angaben des Herstellers in zwei 12-Well-Platten (NUNC, Roskilde, Dänemark) ausgesät. Am nächsten Tag wurden die zu ca. 60% konfluenten Zellen mit 500 µl Normalmedium versorgt. In einem Mikroreaktionsgefäß wurden 100 µl serumfreies Medium mit 2 µl Transfektionsreagenz versetzt. Nach Mischung durch Herauf- und Herunterpipettieren wurde der Ansatz 5 min lang bei RT inkubiert, bevor die *TP53*-siRNA (in einer Endkonzentration von 50 nM oder 100 nM) bzw. die Kontroll-siRNA (in einer Endkonzentration von 100 nM) zugegeben und durch Herauf- und Herunterpipettieren gemischt wurden. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurden 100 µl der jeweiligen Mischung in die entsprechenden Wells gegeben und durch mehrmaliges „Achtenfahren“ und anschließendes 1-minütiges Schütteln bei ca. 200 rpm (Schüttler „Swip“, Firma Edmund Bühler) mit dem Normalmedium auf den Zellen gemischt. Die weiteren Versuchsbedingungen im Falle der 5-FU-Behandlung sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

Am Tag nach der Transfektion wurde das Zellkulturmedium erneuert und die Transfektionseffizienz anhand der mit Fluorescein gekoppelten Kontroll-siRNA transfizierten HeLa-Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops („Axiovert 200 M“, Zeiss, Göttingen; Exzitationswellenlänge $\lambda = 470$ nm, Filter 470/40) überprüft. Mindestens 70% der fast konfluent gewachsenen Zellen wurden transfiziert. Daraufhin wurden die Zellen auf der ersten Platte lysiert: nach zweimaliger Waschung mit kaltem PBS (1 ml/Well) wurden die Zellen in 50 µl 1x LSB/DTT abgeschabt, in Mikroreaktionsgefäßen auf Eis gelagert und 15 s lang mit Ultraschall behandelt. Nach 5-minütiger Denaturierung bei 95 bzw. 97°C wurden die Lysate auf Eis gelagert, 5 min lang zentrifugiert (14.000 rpm/4°C, Eppendorf-Tischzentrifuge „5417R“) und bei -20°C eingefroren. Zwei Tage nach der Transfektion erfolgte die Lyse der HeLa-Zellen auf der zweiten Platte analog zum Vortag. Die Zelllysate wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western blot* analysiert (s. S. 56 - 58).

2.13 Western blot und immunchemische Detektion von Proteinen

2.13.1 Western blot

Die zu untersuchenden Proteine wurden zunächst mittels SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Das SDS-Polyacrylamid-Gel bestand aus einem Sammelgel (oben) und einem Trenngel (unten). Bei einer „8%-SDS-PAGE“ enthält das Trenngel 8% Acrylamid, bei einer „10%-SDS-PAGE“ analog dazu 10% Acrylamid. Die Proben wurden in Gegenwart von 0,4x LSB ohne SDS/mit DTT („SDS-Lysate“) bzw. 0,5x LSB/DTT (Lysate ohne SDS, z. B. Kernextrakte) 3 bis 5 min lang bei 95°C im Heizblock („Thermomixer compact“, Eppendorf, Hamburg) denaturiert, auf Eis abgekühlt, kurz abzentrifugiert („Sigma 112“, Laborzentrifugen GmbH, Osterode/Harz) und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte in 1x Elektrodenspuffer bei 10 mA (Sammelgel) bzw. 20 mA (Trenngel) in einer Gelkammer (Biometra, Göttingen), bis die blau gefärbte Front herauslief. Für die Detektion von kleinen Proteinen mit Massen von ca. 20 kDa wurde die Elektrophorese etwas früher gestoppt. Der Transfer aufgetrennter Proteine aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran[®], Schleicher & Schuell, Dassel) erfolgte im Tankblot-Verfahren („Tankblot TE 22 Mighty SmallTM Transphor“, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA). Die Membran wurde zu Beginn kurz in Transferpuffer äquilibriert. Die Transfereinheit wurde wie folgt zusammengebaut (von Kathode zu Anode): ein dicker und ein dünner Schwamm, ein dickes Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel), ein dünnes Filterpapier (s. o.), das Gel, die blasenfrei aufgelegte Membran, ein dünnes und ein dickes Filterpapier, ein dünner und ein dicker Schwamm. Geblottet wurde 2 h lang in der mit Transferpuffer gefüllten Apparatur unter Wasserkühlung bei 200 mA. Die transferierten Proteine wurden mehrere Minuten lang mit Ponceau S-Färbelösung angefärbt. Nach Entfärbung durch kaltes Wasser wurde die Laufhöhe der Standardproteine mit einem Kugelschreiber eingezeichnet. Die mit Ponceau S gefärbte Nitrozellulosemembran wurde durch kurzes Schütteln in 1x TBS entfärbt. Zur Absättigung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurde die Membran ca. 1 h lang bei RT in *Blocking*-Lösung geschwenkt (Wipptisch „Polymax 1040“, Heidolph, Schwabach).

Der Nachweis spezifischer Proteine in Kernextrakten, Zelllysaten oder Immunpräzipitaten wurde immunchemisch mittels Antikörpern (Tab. 2.8) und Peroxidase-vermittelter Chemilumineszenz geführt (s. S. 58 - 59).

Tab. 2.8: Liste der Antikörper für *Western blot*-Hybridisierungen

Antikörper	Quelle	Zielorganismus	Verdünnung
Aktin (monoklonal)	Sigma	Maus	1 : 10.000
DYRK1A (monoklonal)	Transduction Laboratories, Lexington, USA	Maus	1 : 250
DYRK1B-CT (polyklonal)	BioScience, Göttingen	Kaninchen	1 : 5.000
E2F1 (polyklonal)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	Kaninchen	1 : 1.000
p21 Waf1/Cip1 (monoklonal)	Cell Signaling Technology	Maus	1 : 1.000
p42 MAPK (monoklonal)	Cell Signaling Technology	Maus	1 : 1.000
p53 (polyklonal)	Cell Signaling Technology	Kaninchen	1 : 1.000
Phospho-CREB (Ser133) (polyklonal)	Upstate, Charlottesville, USA	Kaninchen	1 : 1.000
Phospho-Rb (Ser807/811) (polyklonal)	Cell Signaling Technology	Kaninchen	1 : 1.000

Der DYRK1A-Antikörper (Transduction Laboratories, Lexington, USA) bindet an die Aminosäuren 588 bis 746 der Proteinkinase DYRK1A (Kentrup *et al.*, 1996).

Das DYRK1B-CT-Antiserum wurde im Auftrag unseres Labors von der Firma BioScience (Göttingen) hergestellt und erkennt die im C-terminalen Bereich der Proteinkinase DYRK1B lokalisierten 15 Aminosäuren RLGLHGVPQSTAASS. Es wurden in dieser Arbeit sowohl das Prä-Immunsrum (PIS) als auch das Antiserum (AS) der Endblutung des Kaninchens 8228 eingesetzt.

Die Antikörper wurden mit 1x TBST verdünnt, welches 5% (w/v) BSA (Ausnahmen: DYRK1A und DYRK1B: 3% (w/v) BSA) und 0,02% (w/v) Natriumazid enthielt, und bei 4 °C gelagert.

2.13.2 Immunchemische Detektion mittels Peroxidase (POD)-vermittelter Chemilumineszenz

Immunchemische Detektion (außer DYRK1B):

Nach der Blockade unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen durch ca. einstündige Inkubation des *Western blots* mit *Blocking-Lösung* (RT) erfolgte die Inkubation der Membran mit primärem Antikörper ÜN bei 4 °C auf dem Wipptisch (s. o.). Zur Entfernung überschüssigen Antikörpers wurde die Membran dreimal je 5 bis 15 min bei RT in 1x TBST auf dem Wipptisch (s. o.) gewaschen, bevor sie 1 h lang auf dem Schüttler (s. o.) bei RT mit sekundärem Anti-Kaninchen-IgG-POD-Antikörper („*ImmunoPure® Goat Anti-Rabbit IgG, Fc Fragment Specific, Peroxidase Conjugated*“, Pierce, Rockford, USA) oder mit sekundärem Anti-Maus-Ig-POD-Antikörper („*Anti-Mouse Ig, horseradish peroxidase linked whole antibody (from sheep)*“, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) in einer Verdünnung von 1 : 1.000 bis 1 : 5.000 in 5% (w/v) Magermilch/1x TBST inkubiert wurde. Die Membran wurde eine Minute lang in der Detektionslösung (einer frisch hergestellten Mischung aus den ECL-Substratkomponenten I und II) vorsichtig von Hand geschüttelt, wodurch die POD-vermittelte Chemilumineszenz-Reaktion startete. Bei zu schwacher Bandenintensität gelang der Nachweis von DYRK1A nur mit dem „*ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit*“ nach Herstellerangaben (Amersham Pharmacia Biotech). Die Chemilumineszenz wurde auf einem auf der Membran exponierten Röntgenfilm („*Hyperfilm™ MP*“, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) oder im „*Luminescent image analyzer LAS-3000*“ (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) detektiert. Der Film wurde mittels Entwickler und Fixierer (s. S. 13) mit Hilfe der Entwicklermaschine „*OPTIMAX X-Ray Film Processor*“ (PROTEC Medizintechnik GmbH & Co. KG, Oberstenfeld) entwickelt und später mittels Scanner digitalisiert. Die elektronische Auswertung einiger *Western blots* wurde mit Hilfe der Software „*AIDA Advanced Image Data Analyzer*“ (Raytest, Straubenhardt) durchgeführt. Wurde danach der Nachweis eines anderen Proteins angestrebt, erfolgte vor der Inkubation mit dem entsprechenden Antikörper eine mindestens einstündige Behandlung der Membran mit 3% (w/v) BSA/1x TBST zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen.

Immunchemische Detektion von DYRK1B:

Der Nachweis der in verschiedenen Zelllinien endogenen oder überexprimierten Kinase DYRK1B konnte mittels Peroxidase (POD)-vermittelter Chemilumineszenz erbracht werden. Die Nitrozellulose-Membran mit den transferierten Proteinen wurde nach kurzem Anfeuchten mit 1x TBS ÜN bei 4 °C in 3% (w/v) BSA/1x TBST geblockt und nachfolgend 2 h lang bei RT mit dem DYRK1B-Antiserum inkubiert (Schüttler „Swip“, Firma Edmund Bühler). Zur Entfernung ungebundenen Antikörpers wurde die Membran 2x 10 min lang mit Waschpuffer für DYRK1B-*Western blots* (mit 1% NP-40 und 0,1% (w/v) SDS; zur Senkung der Intensität unspezifischer Signale beim Einsatz des DYRK1B-CT-Antiserums) gewaschen und 2x 10 min lang mit 5% Magermilch/1x TBST äquilibriert. Es folgte eine halbstündige Inkubation der Membran mit Anti-Kaninchen-IgG-POD-Antikörper („*ImmunoPure® Goat Anti-Rabbit IgG, Fc Fragment Specific, Peroxidase Conjugated*“, Pierce, Rockford, USA) in einer Verdünnung von 1 : 5.000 in 5% (w/v) Magermilch/1x TBST, bevor sie viermal 15 min lang in 1x TBST geschwenkt (Wipptisch, s. o.) wurde. Nach einminütiger Schüttel-Inkubation in oben beschriebener Detektionslösung wurde die Chemilumineszenz auf einem auf der Membran exponierten Röntgenfilm („*Hyperfilm™ MP*“, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) detektiert (s. o.).

2.14 Quantifizierung der Lebensfähigkeit von Zellen

Mit dem „*Quick Cell Proliferation Assay Kit*“ (BioVision, Mountain View, USA) wurde die Lebensfähigkeit von Zellen schnell und sensitiv quantifiziert. Der Assay basiert auf der Spaltung des Tetrazoliumsalzes WST-1 zum Formazan durch zelluläre mitochondriale Dehydrogenasen. Je größer die Anzahl lebensfähiger Zellen (Proliferation und „Viabilität“) ist, desto mehr mitochondriale Dehydrogenasen sind aktiv und desto mehr Formazanfarbstoff wird gebildet, dessen Absorption photometrisch bestimmt wird. Der Test ist schneller und sensitiver als MTT-basierte Assays.

In mehreren 96-Well-„*Microtiter®*“-Platten mit Abdeckplatten, TC, steril“ mit planem Boden (Greiner Labortechnik, Frickenhausen) wurden in einem Endvolumen von 100 µl NIH-3T3-Zellen, DYRK1B-p69 stabil überexprimierende NIH-3T3-Zellen (je Zelllinie 2.000, 4.000 bzw. 8.000 Zellen pro *Well*) oder SAOS-2-Zellen (12.000 bzw.

24.000 Zellen pro *Well*) ausgesät. DYRK1B-p75 stabil überexprimierende NIH-3T3-Zellen (20.000 Zellen pro *Well*) wurden in mehreren 24-*Well*-Platten (NUNC, Roskilde, Dänemark) in einem Endvolumen von 500 μ l ausgesät. Außerdem wurden in separate *Wells* die *Blanks*, d. h. Normalmedium bzw. serumfreies DMEM-Medium, pipettiert. Die genauen Versuchsbedingungen befinden sich im Ergebnisteil. Nach Zugabe von 10 μ l WST-1 (4-(3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzol-disulfonat)/ECS („*Electro Coupling Solution*“) je 96-*Well* bzw. 50 μ l WST je 24-*Well* wurde die Platte 1 bis 2,5 h lang bei 37°C/5% CO₂ inkubiert und danach 1 min lang bei ca. 200 rpm bei RT geschüttelt (Schüttler, s. o.). Die photometrische Absorptionsmessung im Mikrotiterplattenleser („Lambda E“, MWG, Ebersheim) erfolgte bei einer Wellenlänge von λ = 450 nm und einer Referenzwellenlänge von λ = 610 nm.

2.15 Datenbankrecherchen

Die Datenbank-Recherchen wurden mit der HUSAR-Software des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ, Heidelberg)⁶, mit PubMed, OMIM, UniGene⁷, mit „*Human May 2004 (hg17) assembly*“ der „*UCSC Genome Bioinformatics Group, University of California*“, Santa Cruz, USA⁸, mit den CAGE-Datenbanken „*CAGE primary Database*“ und „*Promoter Database*“⁹ und mit der Datenbank JASPAR¹⁰ für die E2F1-Konsensussequenz durchgeführt. Außerdem dienten die Datenbanken der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Abteilung Menschliche und Tierische Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig)¹¹, der „*American Type Culture Collection*“ (ATCC, Manassas, USA)¹² und des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung GmbH (RZPD, Berlin)¹³ der Datenrecherche.

⁶ <http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/>

⁷ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

⁸ <http://genome.ucsc.edu/>

⁹ <http://fantom3.gsc.riken.jp/>

¹⁰ http://mordor.cgb.ki.se/cgi-bin/jaspar2005/jaspar_db.pl/

¹¹ <http://www.dsmz.de/>

¹² <http://www.lgcpromochem-atcc.com/>

¹³ <http://www.rzpd.de/>

2.16 CAGE-Tag-Analyse

Die Recherche in den CAGE-Datenbanken des FANTOM-Konsortiums und der „RIKEN Genome Exploration Research Group and Genome Science Group“¹⁴ diente der Kartierung der zahlreichen Transkriptionsstarts des humanen *DYRK1A*-Gens.

Die systematische Klonierung kurzer Sequenz-*Tags* der 5'-Enden von cDNAs mit dem Ziel der *High-throughput*-Sequenzierung und Identifizierung von Transkriptionsstarts wird als „*Cap Analysis of Gene Expression*“ (CAGE) bezeichnet (Kodzius *et al.*, 2006) (Abb. 3.2). Ein CAGE-*Tag* ist definiert als 20 bis 21 bp langer cDNA-Sequenzabschnitt der Region, die der *Cap*-Struktur am 5'-Ende eines individuellen mRNA-Moleküls benachbart ist. Durch die Kartierung von CAGE-*Tags* in einzigartigen genomischen Regionen werden Transkriptionsstarts identifiziert (CAGE-*Tag*-Analyse). In 41 unterschiedlichen humanen *full-length*-cDNA-Bibliotheken wurden insgesamt 5.312.921 Transkriptionsstarts durch CAGE identifiziert (Carninci *et al.*, 2006). Der 5'-Startpunkt eines CAGE-*Tags* wird CTSS (*CAGE-Tag Starting Site*) genannt. CAGE-*Tags*, die einander auf demselben DNA-Strang überlappen, bilden ein *Tag-Cluster* (TC) (Carninci *et al.*, 2006).

Zunächst wurde die humane CAGE-„*Promoter Database*“ mit dem Suchbegriff „*DYRK1A*“ durchsucht. Diese Datenbank (Stand: September 2005, erst 15 Gewebe mit 3.106.472 CAGE-*Tags*) stützte sich auf die genomische Nummerierung „*Human May 2004 (hg17) assembly*“ der „*UCSC Genome Bioinformatics Group*“¹⁵ und erfasste noch nicht alle humanen Gewebe: z. B. fehlten Herz- und Skelettmuskel. Über die TU („*Transcriptional Unit*“) ID 723 wurde die TC-Liste angezeigt, die jedem *Tag-Cluster* die Anzahl der CTSSs und der darin enthaltenen CAGE-*Tags* samt Expressionsmuster zuordnet. Über ein beliebiges dieser TC wurde nach Überleitung zur „*CAGE primary Database*“ das entsprechende „*TC Summary*“ mit einer Liste der im TC enthaltenen CTSSs angezeigt. Nach Auswahl einer beliebigen CTSS erschien das entsprechende „*CTSS Summary*“ mit der Gewebsverteilung ihrer *Tags*. Über den blau markierten *DYRK1A*-EST AB015282 (Wang *et al.*, 1998) erschienen schließlich alle *DYRK1A*-CTSSs mit der Anzahl ihrer CAGE-*Tags*, ihrer genomischen Position und ihrer TC-Zugehörigkeit. Die CTSSs mit der Anzahl ihrer CAGE-*Tags* wurden nun in die genomische *DYRK1A*-Sequenz eingetragen (Abb. 3.1).

¹⁴ <http://fantom3.gsc.riken.jp/>

¹⁵ <http://genome.ucsc.edu/>

3. Ergebnisse

3.1 Lokalisation der *DYRK1A*-Promotoren

3.1.1 Alternative Transkriptionsstarts des humanen *DYRK1A*-Gens

Zwei alternative Transkriptionsstarts des humanen *DYRK1A*-Gens wurden von Guimerà und Kollegen (1999) durch eine Kombination von cDNA-Bibliothek-*Screening* und RACE-PCR nachgewiesen. Der Transkriptionsstart der für Herz und Skelettmuskel typischen *DYRK1A*-Spleißvariante *MNBHb* liegt im ersten von Guimerà und Kollegen (1999) definierten Exon, welches in der vorliegenden Arbeit als „Exon1G“ bezeichnet wird. Die ubiquitär exprimierte *DYRK1A*-Spleißvariante *MNBHa* (GenBank®-Nr. AF108830) dagegen wird ab dem 1.899 bp *downstream* vom Transkriptionsstart in Exon1G gelegenen zweiten Exon („Exon2G“) transkribiert. In unserer Arbeitsgruppe wurde mit 5'-RACE-PCR mit der „*BDTM Marathon-Ready cDNA*“ (BD Biosciences Clontech, USA) der humanen Prostataadenokarzinom-Zelllinie PC-3 als *Template* der Transkriptionsstart in Exon2G bestätigt, der im Folgenden mit TS B (Transkriptionsstart B) bezeichnet wird. Desweiteren wurde ein alternativer Transkriptionsstart A (TS A) 772 bp *upstream* vom Transkriptionsstart in Exon2G identifiziert. In Exon1G dagegen wurde in PC-3-Zellen kein Startpunkt der Transkription durch RACE-PCR nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). In PC-3-Zellen startet demzufolge die Transkription des *DYRK1A*-Gens an TS A mit dem nur 17 bp langen „Exon 1A“ oder – alternativ – an TS B mit dem 72 bp umfassenden „Exon 1B“ (Abb. 3.1, Abb. 3.3). Das alternative Spleißen der *DYRK1A*-Prä-mRNA ist in Abb. 3.44 schematisch dargestellt.

Wang und Kollegen (1998) identifizierten zwei weitere *DYRK1A*-Transkriptionsstarts in der hier untersuchten Promotorregion (Abb. 3.1).

Außerdem starten in der in Abb.3.1 dargestellten *DYRK1A*-Promotorregion drei ESTs aus Cerebellum, Endothelzellen bzw. Prostata (Datenbank UniGene). Die große Anzahl und weitläufige Verteilung der Transkriptionsstarts des *DYRK1A*-Gens wird anhand der mit *CAGE-Tag*-Analyse ermittelten Transkriptionsstarts noch deutlicher (s. S. 65 - 66).

-2753	GGAGACCCAC	AAGCAGAGAG	GAAGAAGTTG	GTTGTATAGG	TGGAAGCTTG	37.659.025	
				Exon1G			
-2703	AGCTTGGGAG	GAACCAGGTA	GGGACCTCTC	CTCTGAATAA	GGGGCGCTCT	37.659.075	
-2653	GGGCCACTTC	CTCTTTCTTC	AAAACAATTA	AGTTGACCGT	GGACCTTAAT	37.659.125	
-2603	CACACTAGCA	GGGCAATTTT	GAAACAATAA	TCCGAAAGAA	CTTTTGCCAG	37.659.175	
-2553	CTACGGCAAC	TTTTTTATAT	CATGGAGATC	AGCCTGAAAG	CAAGCTATTT	37.659.225	
-2503	GCCCCACCAC	TTTTTGACCA	ATTTATTTTC	GGTTTAGTCA	GGTTTCTTCC	37.659.275	
-2453	AAGTCTGTGC	TAATCTGAAT	GGTTACCTTA	GTAATTACTT	TTTGACTAAT	37.659.325	
-2403	TTATTTTCGG	TTTAGTCGGA	TTTCTTTCAA	AGTCTGTGCT	AATCTGAATG	37.659.375	
-2353	GTTACCTTAG	TATATCAATG	TCCTAGTAAC	TGTAGCAAGG	ACATTTTTGC	37.659.425	
-2303	TGGAAATCAT	TTAAAGCAGG	TGTATTTGAG	TCATGTAGCA	TAGACAGCGG	37.659.475	
-2253	CATTTACTGC	GAGTTTTTTA	CATCTAATAT	TGTTTATAAG	ATTTTATCTG	37.659.525	
-2203	TTGTCACATT	TGTGAAATTT	ATGAAAAAAA	TTGGTTACGA	ACACTATCAC	37.659.575	
-2153	AAGGTGGCAA	AATCAAGCTT	AGAAATCAAT	TAGTGACTCT	GCTGTAAAAT	37.659.625	
-2103	AGTATATATA	TACACACACA	CTCTTTTTTAG	GTATACATTT	ATTAAATGCC	37.659.675	
-2053	ATTAGAGTTG	GTACAAAATA	CAATTTTTTAG	CTGGTGGCTC	TCTACCGATT	37.659.725	
-2003	ACAACGCAGC	CAGCACAGCA	TACTTGGGTT	TTCAAGCCTC	GGGAGCTCAC	37.659.775	
-1953	CCAGCAATAC	ATAGCTAGGG	AGAAGGGGTA	GGGAGAAATA	AAATCAGCGA	37.659.825	
	+1 (Guimerà, MNBhb)						
-1903	AAGCAAGGAT	ATTAATAAAG	AGTTTTGATG	GTAAAGGACA	AGCAGGCGAA	37.659.875	
-1853	TTAAGACTCT	GGAAACCGAG	AAGGTGTATA	GAAAAGAAAA	CCAGAGAGCT	37.659.925	
	Exon1G			+1 (DA110201)			
-1803	GGACGACAAG	GACACAGTAA	CAGCACAAGG	GGATTCATCT	AAAGGGCATT	37.659.975	
-1753	CCGATGGAGC	AGGCAGGCTG	CGCCCCGAAA	GGTGGGGAGA	GGTTGGAAGC	37.660.025	
			1				
-1703	AGATGGGCAG	GCACAGGCGA	GCGTGCAC TG	CCTGAAAAAG	TTTTCATGAT	37.660.075	
-1653	GGCTCCAGCC	TAATTTCCCA	ACGCTGGTCT	CGGGCGCCAC	AAAACCTGGG	37.660.125	
-1603	CGGCCCGACC	GGAGCCAGGT	GCCAGCCTCA	GGGCCGCCGG	GCCCGGCGCA	37.660.175	
-1553	GCGTCCGGAA	TTCCTGCGAT	GTCTGGGGCG	CGGCGGTGGC	TCCTCCCCGC	37.660.225	
			1				
-1503	CCCCACCACG	GCCTCCGCCG	GCATTTTCCG	GCTAGGAGGC	CCGCCAGCCC	37.660.275	
	1	1					
-1453	TTCTGAAGAAC	CGGCTCCACG	CGCGGACGGT	CGCGGCCGCC	GCGCTTCCCG	37.660.325	
	A/a						
-1403	GGGAGAGAGG	CGAGCGCGGC	GCCCGGACCG	CGGTGAGAGC	CCTCCAGGCC	37.660.375	
-1353	CGGGCGCGCG	GGGTGGGCTT	CCCGGGTCCC	CGCCCGAAGG	CCGCGGCGCC	37.660.425	
-1303	CCTCCTCCTC	CCCCTCCCCC	GCCCGGGGCA	GCCCGCCCT	CCCCCGGCG	37.660.475	
-1253	CGGGCGGCGC	TGCGGGCGCC	GACGCGGAAG	CGCGGGGCGC	TAGGGCTGCG	37.660.525	
				2			
-1203	GGGGCGGCGG	CGCGGGAGGC	CGCGCGCGCT	CCCCGGGCCG	CAGTCGGCGC	37.660.575	
-1153	GGGCGCGGGG	CGGGGCGGGG	CGGCCGGGAG	GCGGCGGGCG	ATCGCGCACA	37.660.625	
-1103	GGCCTGGCCG	CCGCCTCGCC	CCCCCTTCCC	CAGCCCCTAC	CCTCCCTCGG	37.660.675	
-1053	CCTAGCCGTC	CCCCTCCTCT	CCCCTCCCCC	GGGCGAATCA	CGCGCCCTCC	37.660.725	
-1003	TCTGACACTC	GTAGCGGACC	CGAGCTCCGA	ATTTATCCTT	CACGTGACCT	37.660.775	
-953	GAGGGGGTTG	GGTGGTTGGC	TGGGGACAGA	GGGGGAGACG	GAAAGGAGGG	37.660.825	
-903	AACGGAATCT	GCCGTTACCT	GAGCAACAGG	CCCGCCCTC	CGGCTCGGGG	37.660.875	
			CREB				
-853	CTGGGGGGCG	GGAGGAGG	GAC GTCA	GACACGTC	CAGCCGGGGT	TTTGCGTTTT	37.660.925
	2	2	16	1	8	1	
-803	GATTGACAGT	TGCTATAGCG	ACCGGGTCGG	TCCGTCGCCA	TTTTGTTGCT	37.660.975	
			1	1	5		
-753	TGTTTTTTTT	TTAAACCCTT	TCGCTTCCCC	CCCGAATAAT	AATAAAAAGC	37.661.025	
	16	1	1				
-703	CCCATTGGAG	TGAGGCGGGG	GTGGCGGGCG	CAACCGCGGC	GGGGGTATCC	37.661.075	
					2		
-653	GGGGAGACTG	CTGCTGTCTG	TGCTGCTGAT	CGCGGCCAG	GTCGGCCTCA	37.661.125	
				+1 (Wang, AB015282)			

- Fortsetzung s. nächste Seite! -



64

3.1.2 CAGE-Tag-Analyse der *DYRK1A*-Promotorregion

Die CAGE-Datenbanken-Recherche des FANTOM-Konsortiums und der „RIKEN Genome Exploration Research Group and Genome Science Group“ (s. S. 60) diente der Kartierung der Transkriptionsstarts des humanen *DYRK1A*-Gens. Die systematische Klonierung kurzer Sequenz-Tags der 5'-Enden von cDNAs mit dem Ziel der High-throughput-Sequenzierung und Identifizierung von Transkriptionsstarts wird als „Cap Analysis of Gene Expression“ (CAGE) bezeichnet (Kodzius *et al.*, 2006) (Abb. 3.2 in Anlehnung an Kodzius und Kollegen (2006)). Ein CAGE-Tag ist definiert als 20 bis 21 bp langer cDNA-Sequenzabschnitt der Region, die der *Cap*-Struktur am 5'-Ende eines individuellen mRNA-Moleküls benachbart ist (Carninci *et al.*, 2006). Durch die Zuordnung von CAGE-Tags zu eindeutigen genomischen Regionen (CAGE-Tag-Analyse, s. S. 61) wurden 55 *DYRK1A*-Transkriptionsstarts innerhalb der 1.700 bp *upstream* von TS B identifiziert. Innerhalb der 900 bp-Region *upstream* von *DYRK1A*-TS B starten 105 Transkripte ohne Gewebsspezifität an 22 verschiedenen Positionen, wohingegen nur 30 Transkripte gewebsspezifisch sind (Abb. 3.1).

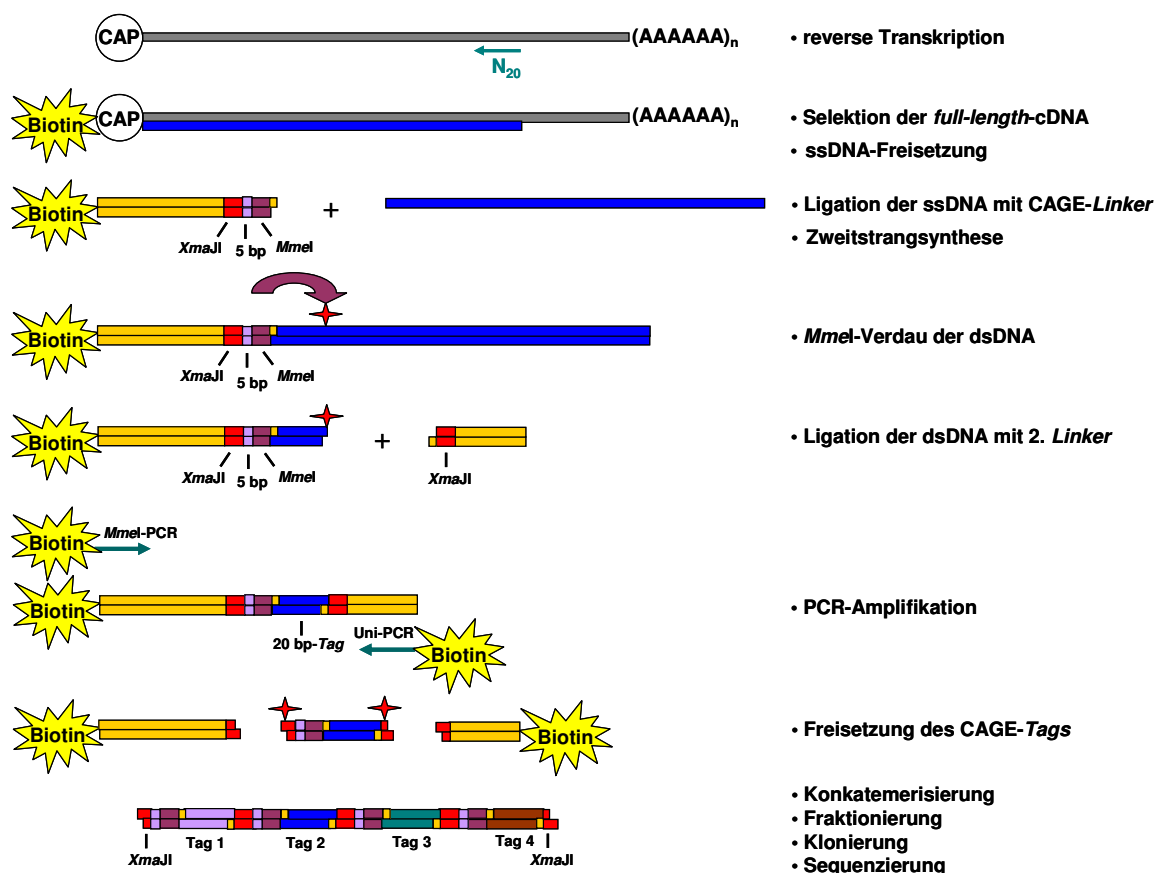


Abb. 3.2: Schema der Herstellung einer CAGE-Bibliothek

Von Carninci und Kollegen (2006) werden vier Promotorgruppen hinsichtlich der CAGE-Tag-Verteilung innerhalb eines *Tag-Clusters* unterschieden: die „*single dominant peak class*“ (SP), die „*general broad distribution class*“ (BR), die „*broad distribution with a dominant peak class*“ (PB) und die „*bi- or multimodal distribution class*“ (MU). Zwei der neun *Tag-Cluster* innerhalb der 900 bp *upstream* von *DYRK1A*-TS B (Abb. 3.1) liegen nahe bei den durch 5'-RACE-PCR in PC-3-Zellen ermittelten Transkriptionsstarts A bzw. B (Abb. 3.3).

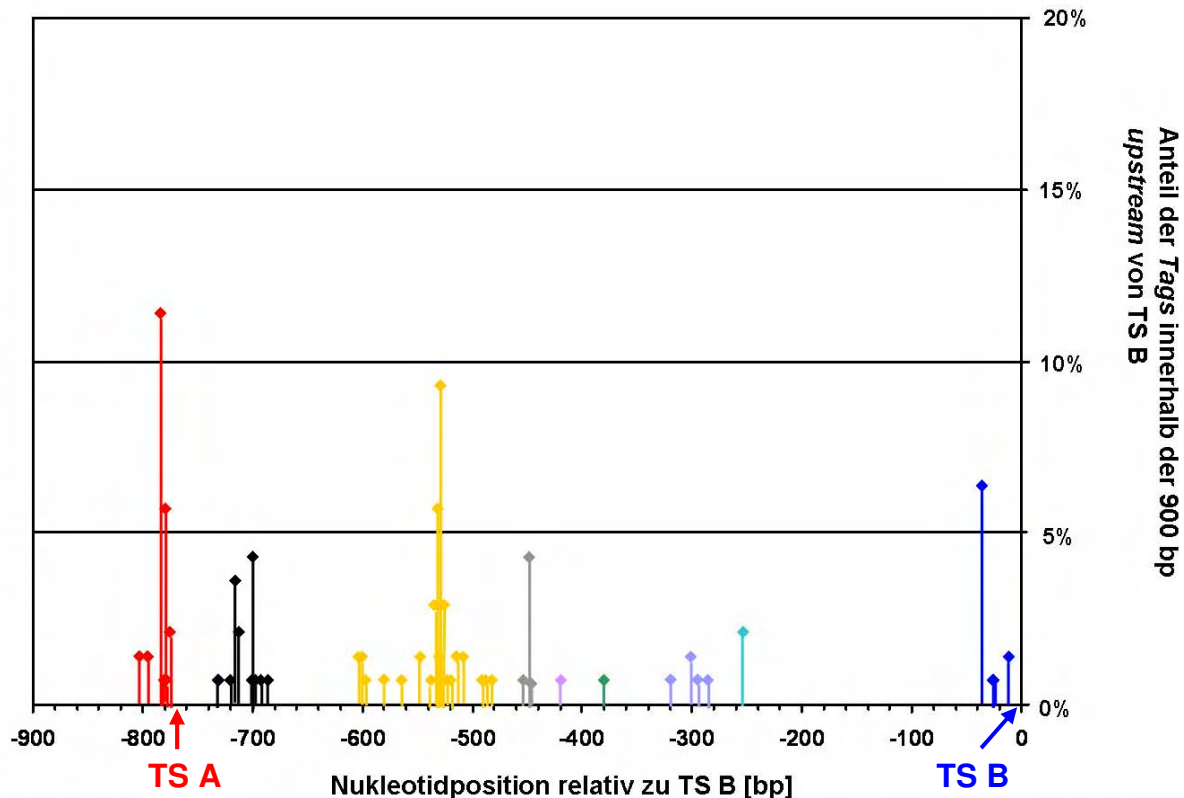


Abb. 3.3: CAGE-Tag-Verteilung innerhalb der 900 bp *upstream* von TS B im *DYRK1A*-Gen

Die mit der CAGE-Tag-Analyse ermittelten *Tag-Cluster* (TC) sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. TS: Transkriptionsstart.

Es wurde *in silico* und mit PCR eine unmethylierte CpG-Insel in der *DYRK1A*-Promotorregion um TS B herum nachgewiesen (Yamada *et al.*, 2004) (Abb. 3.1). Bei Promotor B handelt es sich in der Tat um einen GC-reichen Promotor ohne apparente TATA-Box. Fünf der neun einzelnen Datenbank-definierten *Tag-Cluster* der 900 bp umfassenden *DYRK1A*-Promotorregion lassen sich in die für TATA-Box-lose Promotoren typische MU- bzw. PB-Klasse einordnen. Das *Tag-Cluster* vor TS A (rot) spricht für einen bimodalen Promotor A (MU-Klasse), die CAGE-Tags vor TS B (blau) verteilen sich breit mit einem dominanten *Peak* (PB-Klasse; Abb. 3.3).

3.1.3 Kein Promotor *upstream* von Exon1G in SAOS-2- und COS-7-Zellen

Es existieren noch keine CAGE-Bibliotheken von Herz- und Skelettmuskel. Um nun die 5'-flankierende Region des Exons1G auf Promotoraktivität zu untersuchen, wurden Reporter-Gen-Assays in transient transfizierten COS-7-Zellen (Niere der Afrikanischen Grünen Meerkatze) und SAOS-2-Zellen (humanes Osteosarkom) durchgeführt. Jede der beiden Zelllinien wurde in einer Dichte von 200.000 Zellen/Well einer *Multidish*-Platte mit 6 Wells ausgesät, einen Tag später mit 1 µg pGL3-Basic-Leervektor (Kontrolle) bzw. 1 µg pGL3-hDYRK1A-Exon1G transient transfiziert und nach weiteren zwei Tagen mit dem „*Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System*“ lysiert. Die „Aktivität“ des 827 bp umfassenden Bereichs *upstream* von Exon1G betrug in Relation zum Leervektor (= 1 gesetzt) in COS-7-Zellen $0,136 \pm 0,001$ und in SAOS-2-Zellen $0,116 \pm 0,045$ (jeweils RLU-Mittelwert zweier Wells pro Promotorkonstrukt \pm Abweichung der beiden Messwerte vom Mittelwert; Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass die *DYRK1A*-Transkription weder in COS-7- noch in SAOS-2-Zellen mit Exon1G startet.

3.1.4 Promotoraktivitäten der 5'-flankierenden Bereiche der Transkriptionsstarts A und B des *DYRK1A*-Gens

Zunächst wurden die 1.453 bp-Region *upstream* von Transkriptionsstart B (-1453 bp) des *DYRK1A*-Gens sowie fünf Deletionsfragmente abnehmender Länge im Reporter-Genvektor pGL3-Basic nach transienter Transfektion von SAOS-2-Zellen von Frau Ana-Lena Reiners auf Promotoraktivität untersucht. Die -1.453 bp- bzw. -904 bp-Regionen zeigten die größten Promotoraktivitäten. Sie beinhalten allerdings beide Transkriptionsstarts (TS A bei -772 bp und TS B bei +1 bp), sodass eine eindeutige Aussage über die Promotoraktivität *upstream* von TS B nur anhand von Konstrukten mit Fragmenten kürzer als -772 bp getroffen werden konnte. Die -418 bp-Region wies ca. 23% der Promotoraktivität des 1.453 bp-Bereiches mit zwei Transkriptionsstarts auf und nahm mit zunehmender 5'-Deletion ab (Abb. 3.4). Die -23 bp-Nukleotidsequenz zeigte keine Promotoraktivität mehr, d. h. der minimale Promotor B umfasst mindestens 24 bp. Ein ähnliches Ergebnis wurde in COS-7-Zellen erzielt (Daten nicht gezeigt).

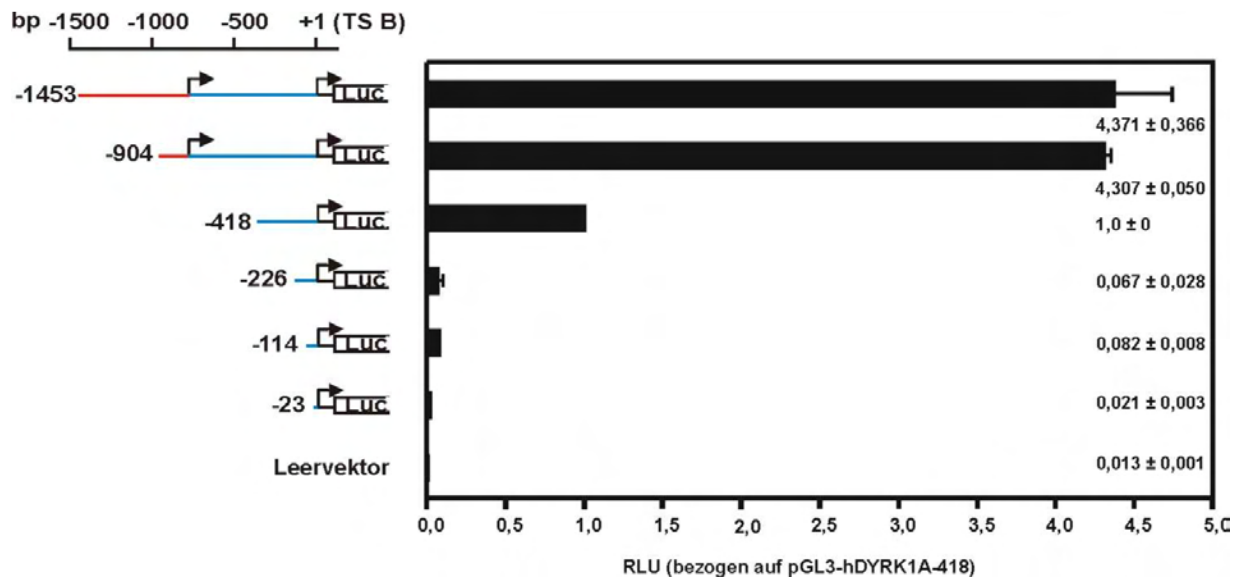


Abb. 3.4: *DYRK1A*-Regulation durch zwei Promotoren A und B in SAOS-2-Zellen

SAOS-2-Zellen (200.000/Well einer 6-Well-Multidish-Platte) wurden am Tag nach der Aussaat mit 0,5 µg Leervektor (Kontrolle) bzw. pGL3-hDYRK1A-Promotorkonstrukt in je 2 Wells transient transfiziert. Nach zwei Tagen erfolgten Lyse und Messung der RLU mit dem „Dual-Luciferase® Reporter Assay System“. Da die Gesamtproteinbestimmung durch den PLB-Lysepuffer gestört wurde, wurden die RLU-Werte nicht auf Gesamtprotein normiert. Angegeben sind die Mittelwerte eines Versuches ± Abweichung der beiden Messwerte vom Mittelwert. Als Bezug diente der Mittelwert der mit pGL3-hDYRK1A-418 transfizierten Zellen.

Um nun die Promotoren A und B zu charakterisieren, wurde die Luciferase-Aktivität der 681 bp *upstream* von TS A (mutmaßliche Promotor A) in SAOS-2-Zellen im Reporter-Gen-Assay mit den Luciferase-Aktivitäten der beide Transkriptionsstarts umfassenden Region, der -742 bp-Region (mutmaßlicher Promotor B) und der sukzessive 5'-deletierten -742 bp-Region verglichen (Abb. 3.5). Promotor A war in SAOS-2-Zellen 14,4 ± 3,6-fach aktiver als Promotor B (Mittelwert ± SEM, n = 6). Die Basalaktivitäten von Promotor B, -647 bp, -541 bp, -418 bp bzw. -324 bp waren recht konstant, nahmen jedoch bei 5'-Deletion auf -226 bp bzw. -114 bp um ca. 90% ab. In Gegenwart beider Transkriptionsstarts hingegen stieg die Promotoraktivität sprunghaft auf das ca. Fünf- bis Siebenfache von Promotor B an (Abb. 3.5). Dies bedeutet, dass die Transkription des *DYRK1A*-Gens von zwei unabhängigen, alternativen Promotoren reguliert wird.

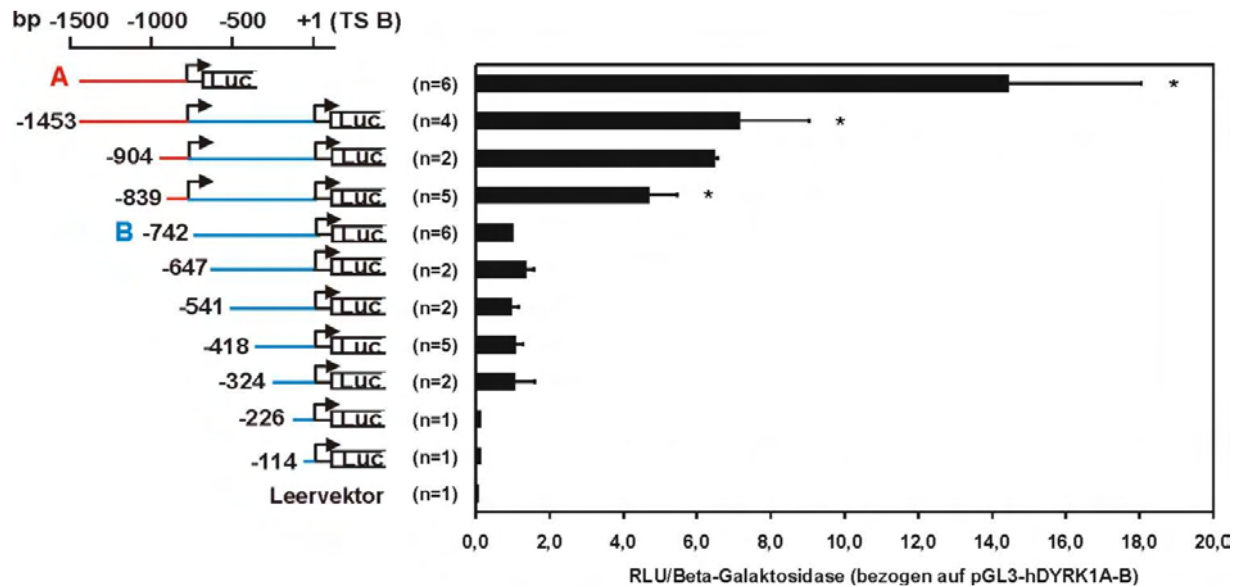


Abb. 3.5: Höhere Aktivität von Promotor A im Vergleich zu Promotor B in SAOS-2-Zellen

SAOS-2-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät (200.000/Well) und am nächsten Tag mit 0,1 µg Leervektor (Kontrolle) bzw. pGL3-hDYRK1A-Promotor(fragment) und 0,25 µg pSV-β-Galactosidase in je 2 Wells transient transfiziert. Nach 2 Tagen erfolgten Lyse und Messung der RLU mit dem „Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer“. Die RLU wurden auf Beta-Galaktosidase normiert. Angegeben sind die Mittelwerte aus n unabhängigen Versuchen ± SEM (falls $n > 2$) bzw. ± Abweichung vom Mittelwert (falls $n \leq 2$). Als Bezug diente in jedem Versuch der Mittelwert der mit pGL3-hDYRK1A-B transfizierten Zellen. *: signifikant ($p < 0,05$) gegenüber Promotor B.

Um eine Zelllinienspezifität der Promotoraktivitäten zu überprüfen, wurden die Aktivitäten der Promotoren A und B in zwei weiteren eukaryotischen Zelllinien in Reporter-Gen-Assays untersucht. In der humanen Prostataadenokarzinom-Zelllinie PC-3 war Promotor A $10,0 \pm 2,8$ -fach aktiver als Promotor B ((RLU/Gesamtprotein)-Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen mit je 2 Wells pro Promotorkonstrukt ± Abweichung vom Mittelwert; Daten nicht gezeigt). In der Phäochromozytom-Zelllinie PC-12 (Ratte) war Promotor A um den Faktor $3,4 \pm 0,4$ aktiver als Promotor B ((RLU/Beta-Galaktosidase)-Mittelwert zweier Wells pro Promotorkonstrukt ± Abweichung der beiden Messwerte vom Mittelwert; Daten nicht gezeigt).

3.2 Einfluss von Serum auf die Aktivitäten der beiden alternativen *DYRK1A*-Promotoren

Die in der murinen Fibroblasten-Zelllinie NIH-3T3 während eines dreitägigen Entzuges von Serum zunehmende *DYRK1A*-Proteinmenge (s. S. 112 - 113) wäre z. B. durch eine erhöhte Promotoraktivität durch Serumentzug erklärbar. Um dies zu untersuchen, wurden die Aktivitäten der *DYRK1A*-Promotoren A und B in ca. 17 h lang serumfrei bzw. unter Normalbedingungen gewachsenen SAOS-2-Zellen im Reporter-Gen-Assay ermittelt. Im Vergleich zu Wachstum unter Normalbedingungen erhöhte der Serumentzug die Aktivität von Promotor A signifikant ca. 1,7-fach, die Aktivität von Promotor B sogar fast 3-fach (Mittelwerte aus 3 bzw. 5 unabhängigen Versuchen mit je zwei *Wells* pro Promotorkonstrukt; Abb. 3.6).

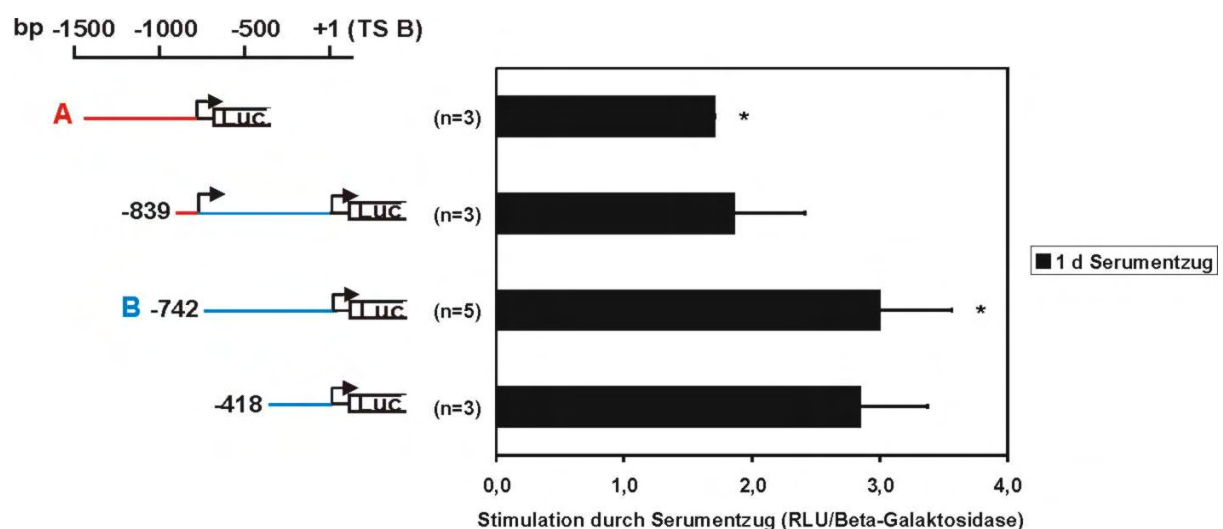


Abb. 3.6: Erhöhte Aktivitäten der *DYRK1A*-Promotoren A und B in SAOS-2-Zellen bei Serumentzug

SAOS-2-Zellen (200.000/6-Well) wurden am Tag nach der Aussaat mit 0,1 µg des angegebenen Promotorkonstruktes und 0,25 µg pSV-β-Galactosidase in je 4 *Wells* transient transfiziert. Fünf Stunden nach der Transfektion wurde das Medium durch serumfreies Medium bzw. Normalmedium (Kontrolle) ersetzt. Nach ca. 17 h erfolgten Lyse und Messung mit dem „*Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer*“. Die RLU wurden auf Beta-Galaktosidase normiert. Angegeben sind die Mittelwerte aus n unabhängigen Versuchen ± SEM. Als Bezug diente jeweils der Mittelwert der analog transfizierten, in Normalmedium (Kontrolle) gewachsenen Zellen. *: signifikant ($p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle.

Der Effekt des Serums auf die Aktivität von Promotor B wurde in den humanen Zelllinien SAOS-2 und PC-3 näher untersucht. In SAOS-2-Zellen war die Aktivität des *DYRK1A*-Promotors B nach ein- bzw. zweitägigem Wachstum unter Serumentzug bzw. Serumarmut (1% statt 10% FCS) im Vergleich zum Wachstum in Normalmedium (10% FCS, Kontrolle) erhöht. Nach zwei Tagen Serumentzug bzw. -armut war der Effekt etwas abgeschwächt (Abb. 3.7 A).

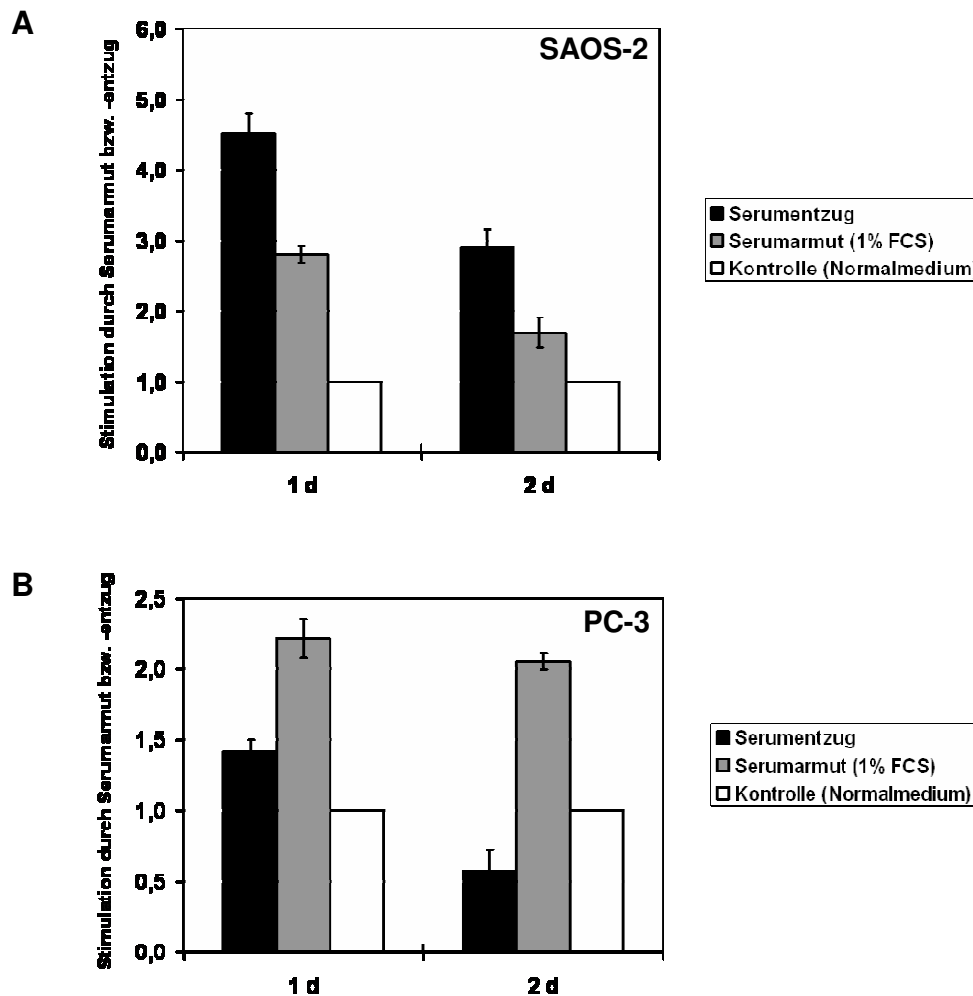


Abb. 3.7: Erhöhte Aktivität von *DYRK1A*-Promotor B bei Serumarmut bzw. Serumentzug

A: SAOS-2-Zellen (200.000/6-Well) wurden am Tag nach der Aussaat mit 0,1 μ g pGL3-hDYRK1A-B und 0,25 μ g pSV- β -Galactosidase in 12 Wells transient transfiziert. Fünf Stunden nach der Transfektion wurde das Medium durch serumfreies Medium, serumarmes Medium (1% FCS) bzw. Normalmedium (Kontrolle) ersetzt. Am Tag danach erfolgten Lyse und Messung der RLU mit dem „Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer“. Die RLU wurden auf Beta-Galaktosidase normiert. Angegeben sind die Mittelwerte eines Versuches \pm Abweichung der beiden Messwerte vom Mittelwert. Als Bezug diente der Mittelwert von analog transfizierten, in Normalmedium (Kontrolle) gewachsenen Zellen.

B: Analoger Versuch in PC-3-Zellen.

Auch in PC-3-Zellen aktivierte Serumarmut Promotor B, wohingegen der vollständige Entzug des Serums Promotor B nach einem Tag aktivierte und nach zwei Tagen hemmte (Abb. 3.7 B). Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse auf eine Aktivierung des *DYRK1A*-Promotors B nach eintägiger Serumarmut (1% FCS) in humanen Zelllinien, aber auf eine unterschiedlich starke Aktivierung des Promotors B nach eintägigem Serumentzug hin. Wurden SAOS-2-Zellen zwei Tage lang mit weniger oder keinen Wachstumsfaktoren etc. versorgt, war Promotor B immer noch aktiver als unter normalen Wachstumsbedingungen (10% FCS). In PC-3-Zellen dagegen galt dies nur nach Serumarmut, nicht jedoch nach Serumentzug.

3.3 Auswirkungen des DNA-Synthese-Inhibitors 5-Fluorouracil (5- FU) auf *DYRK1A*-mRNA und *DYRK1A*-Protein

3.3.1 Differentielle Genexpression von *DYRK1A* in humanen Tumoren („*Cancer Profiling Array I*“)

Zum Vergleich der *DYRK1A*-Expression in gesundem und malignem Gewebe wurde der „*Cancer Profiling Array I*“ mit einer *DYRK1A*-cDNA-Sonde hybridisiert (s. S. 50 - 53). Der *Array* beinhaltet neben Positivkontrollen (humane Krebszelllinien) und Negativkontrollen (z. B. *E. coli*-DNA) 241 cDNA-Paare aus Gesamt-RNA verschiedener humaner Gewebetypen, wobei jedes Paar die cDNAs aus Tumorgewebe (T) und normalem Gewebe (N) eines einzelnen Patienten repräsentiert. Bei einigen Patienten war sogar ein Vergleich der *DYRK1A*-Genexpression in normalem Gewebe, in Metastasen und im Tumorgewebe möglich: von den umrandeten cDNAs entstammt die linke cDNA normalem Gewebe, die rechte cDNA metastatischem Gewebe und die cDNA darunter dem Tumorgewebe.

Die von Kentrup und Kollegen (1996) publizierte ubiquitäre *DYRK1A*-Expression bestätigte sich und variierte sowohl in gesundem Gewebe als auch in Tumor- und Metastasengewebe zu stark von Patient zu Patient, um eine eindeutige Aussage zu treffen (Abb. 3.8). Die unspezifische Hybridisierung der *DYRK1A*-cDNA-Sonde mit den Kontrollen (*E. coli*-DNA und humane genomische DNA) deutete auf eine Kontamination der *DYRK1A*-Sonden-cDNA mit *E. coli*-DNA bzw. repetitive Sequenzen in der *DYRK1A*-Sonde hin. Da sich Tumorzellen der meisten Gewebe nicht wesentlich

in ihrer *DYRK1A*-Expression unterschieden (Abb. 3.8), wurde untersucht, ob sich Tumorzelllinien in ihrer *DYRK1A*-Expression unterscheiden (s. S. 74 - 76).

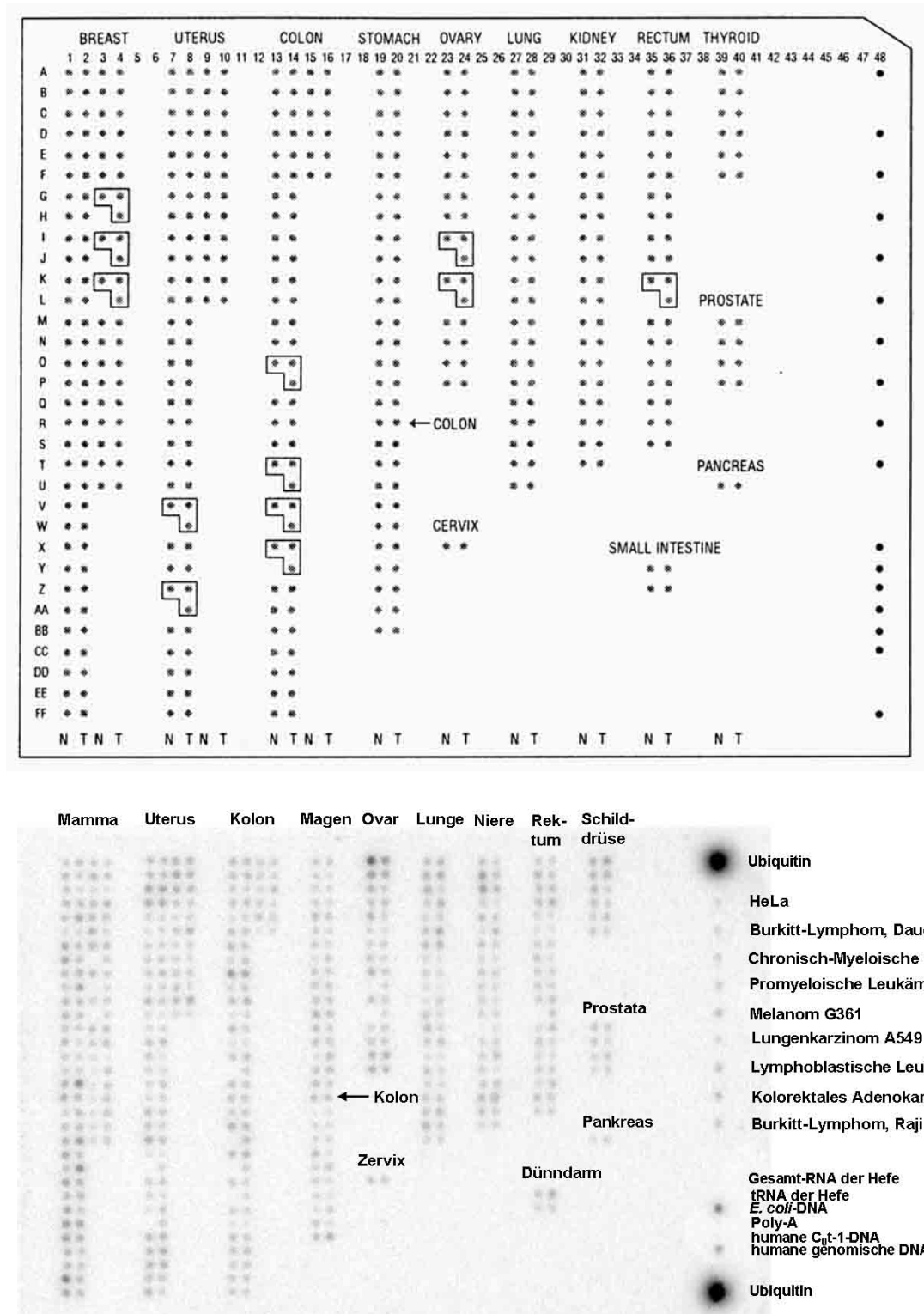


Abb. 3.8: Schema des „Cancer Profiling Arrays I“ (oben bzw. s. Text) und Regulation der *DYRK1A*-mRNA in humanen Tumorzellen bzw. Tumorzelllinien diverser Gewebe auf diesem Array (unten)

3.3.2 Gewebsspezifische Hochregulation der *DYRK1A*-mRNA durch 5-FU („*Cancer Cell Line Profiling Array*“)

Um herauszufinden, ob humane Tumorzelllinien unterschiedlicher Gewebe in ihrem *DYRK1A*-mRNA-Gehalt variieren, und ob exogene Faktoren, wie z. B. Antimetaboliten, die Expression von *DYRK1A* in diesen unterschiedlichen Tumorzelllinien beeinflussen, wurde der „*Cancer Cell Line Profiling Array*“ (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA) mit einer h*DYRK1A*-cDNA-Sonde (s. S. 50 - 53) hybridisiert. Auf dem *Array* befinden sich die nach Herstellerangaben gegen mehrere *Housekeeping*-Gene normierten Gesamt-cDNAs 26 verschiedener humaner Tumorzelllinien. Jede dieser Linien wiederum wurde zuvor 26 unterschiedlichen Behandlungen unterzogen: Hitzeschock, UV- oder Gamma-Strahlung, oxidativem Stress (Wasserstoffperoxid), Serumarmut (0,5% FCS) oder Chemotherapeutika (z. B. 5-Fluorouracil). In der zweiten Spalte ist jeweils die Gesamt-cDNA der entsprechenden unbehandelten Zelllinie als Kontrolle aufgetragen. Die Konzentration des jeweiligen Chemotherapeutikums bzw. die Dauer des Hitzeschocks (44 °C) oder der UV-Bestrahlung, die eine 50-prozentige Wachstumshemmung nach 48 h bewirkte (IC₅₀), wurde vom Hersteller in einem „Viabilitäts“-Assay (MTT-Assay) für jede Zelllinie ermittelt und angewendet (Abb. 3.10).

Ein erhöhter *DYRK1A*-mRNA-Gehalt war für die humane Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 (*TP53* -/-)¹⁶ und für die humane Prostataadenokarzinom-Zelllinie PC-3 (*TP53* -/-) charakteristisch, denn die *DYRK1A*-Sonde hybridisierte vornehmlich mit den Kontroll-cDNAs dieser beiden Linien (Abb. 3.10). Die unspezifische Hybridisierung der *DYRK1A*-cDNA-Sonde mit den Kontrollen *E. coli*-DNA und humaner genomischer DNA deutete auf eine Kontamination der *DYRK1A*-Sonden-cDNA mit *E. coli*-DNA bzw. repetitive Sequenzen in der *DYRK1A*-Sonde hin. Besonders interessant erschien, dass die S-Phase-Inhibitoren 5-Fluorouracil (5-FU, 80 µM, 48 h) und L-Mimosin (3 mM, 48 h) sowie der RNA-Syntheseinhibitor PALA ((N-Phosphonacetyl)-L-aspartat, 0,5 mM, 48 h) die *DYRK1A*-mRNA speziell in PC-3-Zellen hochregulierten. Der S-Phasen-Hemmstoff Methotrexat (Amethopterin bzw. MTX, 2 µM, 48 h) stimulierte die *DYRK1A*-Expression in PC-3- und HCT116 (*TP53* -/-)-Zellen (Abb. 3.10).

¹⁶ *TP53*: Gen, das p53 kodiert

Bei 5-FU (Abb. 3.9) handelt es sich um ein *Prodrug*, dessen Metabolit Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP) die Thymidylatsynthase (TS) inhibiert, sodass die DNA-Synthese gehemmt wird. Außerdem werden die 5-FU-Metaboliten Fluorouridintriphosphat (FUTP) bzw. Fluorodesoxyuridintriphosphat (FdUTP) in die RNA bzw. DNA schnell wachsender Zellen eingebaut, sodass diese so geschädigt werden, dass sie nicht mehr funktionstüchtig sind.

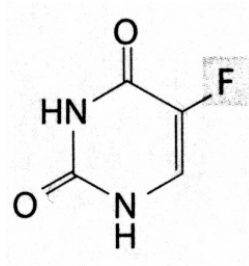


Abb. 3.9: Strukturformel des 5-Fluorouracils (5-FU)

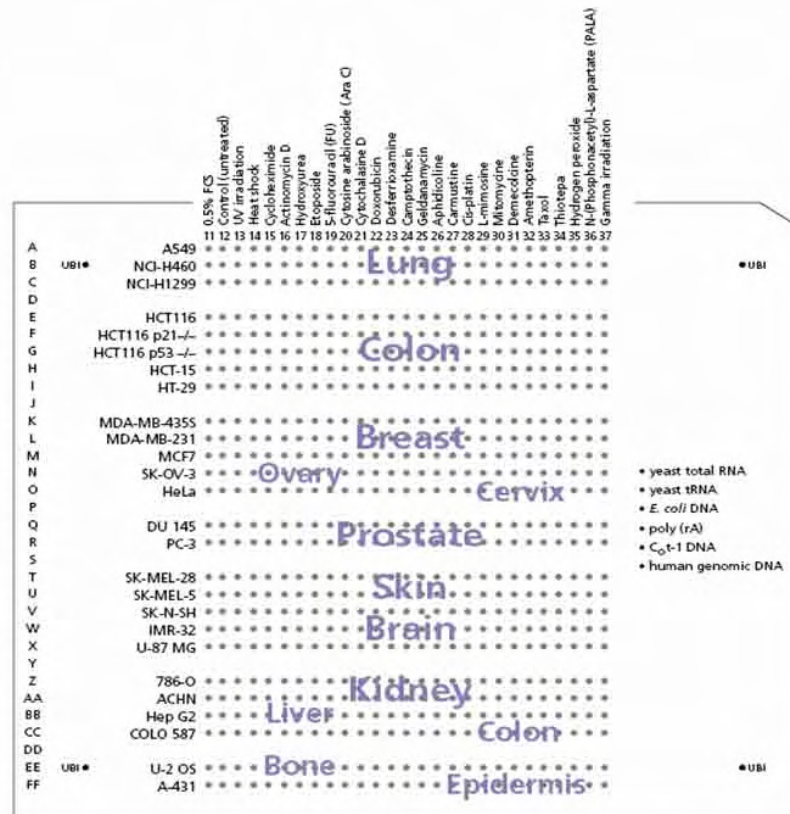


Figure 1. Profile gene expression in 26 cancer cell lines treated with 26 individual agents using the Cancer Cell Line Profiling Array. The array lets you monitor different conditions simultaneously using a total of 702 complex cDNA samples representing 11 tissue types. For more information about cell lines and treatments represented on this array, visit bioinfo.dontech.com/dparray. UBI: ubiquitin cDNA. Columns 11–37 = treatments. Rows A–FF = cell lines.

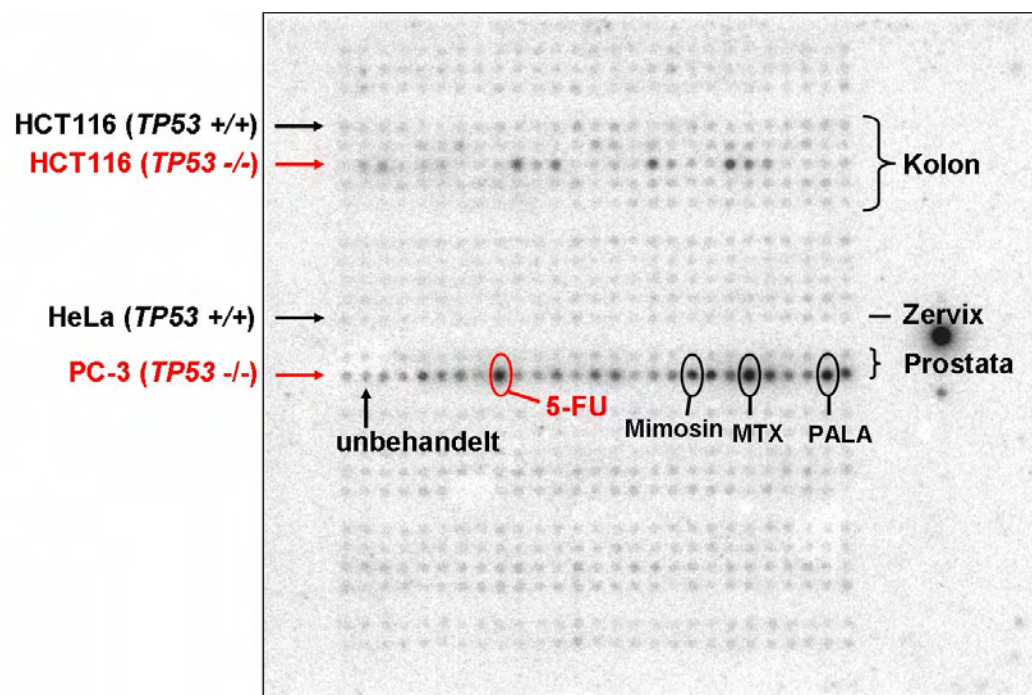


Abb. 3.10: Schema des „Cancer Cell Line Profiling Arrays“ (oben bzw. s. Text) und Regulation der *DYRK1A*-mRNA in humanen Tumorzelllinien diverser Gewebe auf diesem Array (unten)

3.3.3 Hochregulation der *DYRK1A*-mRNA durch 5-FU

Um diese starke Wirkung von 5-FU näher zu untersuchen, wurden PC-3- bzw. PhoenixTM-Zellen (modifizierte HEK 293T-Zelllinie) drei Tage lang mit 5-FU [100 µM] (Dosis, die laut MTT-Assay für den „*Cancer Cell Line Profiling Array*“ die Lebensfähigkeit der PC-3-Zellen nach zwei Tagen um mehr als die Hälfte senkt) bzw. DMSO als Kontrolle behandelt und ihre *DYRK1A*-Expression in *Northern blots* analysiert. Sowohl die *DYRK1A*-mRNA als auch die *DHFR* (Dihydrofolatreduktase, ein als S-Phasen-Marker dienendes E2F1-*Target*-Gen, Positivkontrolle)-mRNA wurden durch 5-FU in beiden Zelllinien hochreguliert. Die mRNA des *Housekeeping*-Gens *GAPDH* diente als Ladungskontrolle (Abb. 3.11).

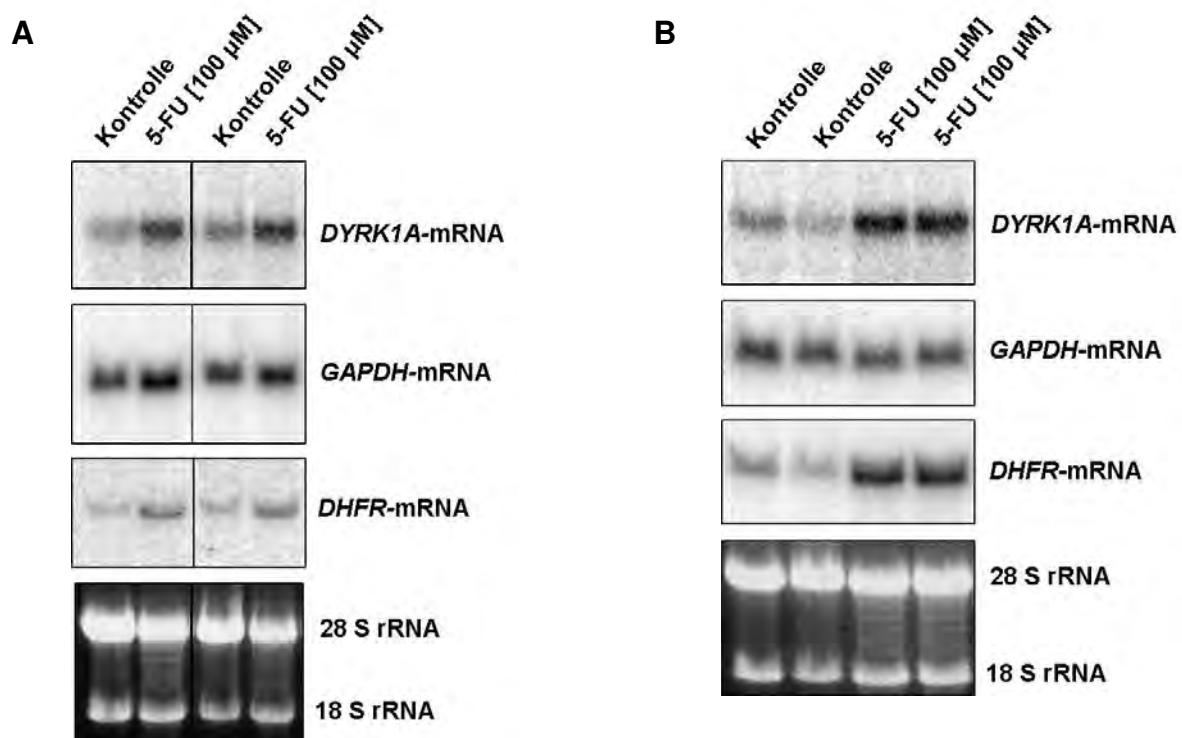


Abb. 3.11: Hochregulation der *DYRK1A*- und der Dihydrofolatreduktase (*DHFR*)-Expression durch dreitägige Behandlung von PC-3- bzw. PhoenixTM-Zellen mit 5-FU

A: Subkonfluente PC-3-Zellen auf 10 cm-Platten wurden 3 Tage lang mit 5-FU [100 µM] bzw. DMSO (analoges Volumen des Lösungsmittels von 5-FU als Kontrolle) in Normalmedium behandelt. Dann wurde die Gesamt-RNA isoliert und ein *Northern blot* mit Gesamt-RNAs aus zwei unabhängigen Versuchen angefertigt. Gezeigt sind die Hybridisierungen des *Northern blots* mit *DYRK1A*-, *GAPDH*- bzw. *DHFR*-cDNA (Positivkontrolle) sowie die Ethidiumbromidfärbung (unten), die – wie die *GAPDH*-mRNA – als Ladungskontrolle diente.

B: Analoges Versuch in PhoenixTM-Zellen. Hier wurde das Normalmedium mit 5-FU bzw. DMSO (s. o.) nach 2 Tagen erneuert. Gezeigt sind die Hybridisierungen (s. o.) eines *Northern blots* mit Gesamt-RNAs eines Versuches mit je zwei identisch behandelten Platten.

In diesen beiden humanen Zelllinien wurde desweiteren ein dosisabhängiger Anstieg der *DYRK1A*- und *DHFR*-Genexpression durch ein-, zwei- bzw. dreitägige Behandlung mit 5-FU [10/30/90 µM] in *Northern blots* nachgewiesen, wobei die *DYRK1A*-mRNA-Kinetik im Vergleich zur Kinetik der *DHFR*-mRNA etwas verzögert war (Abb. 3.12, Abb. 3.13).

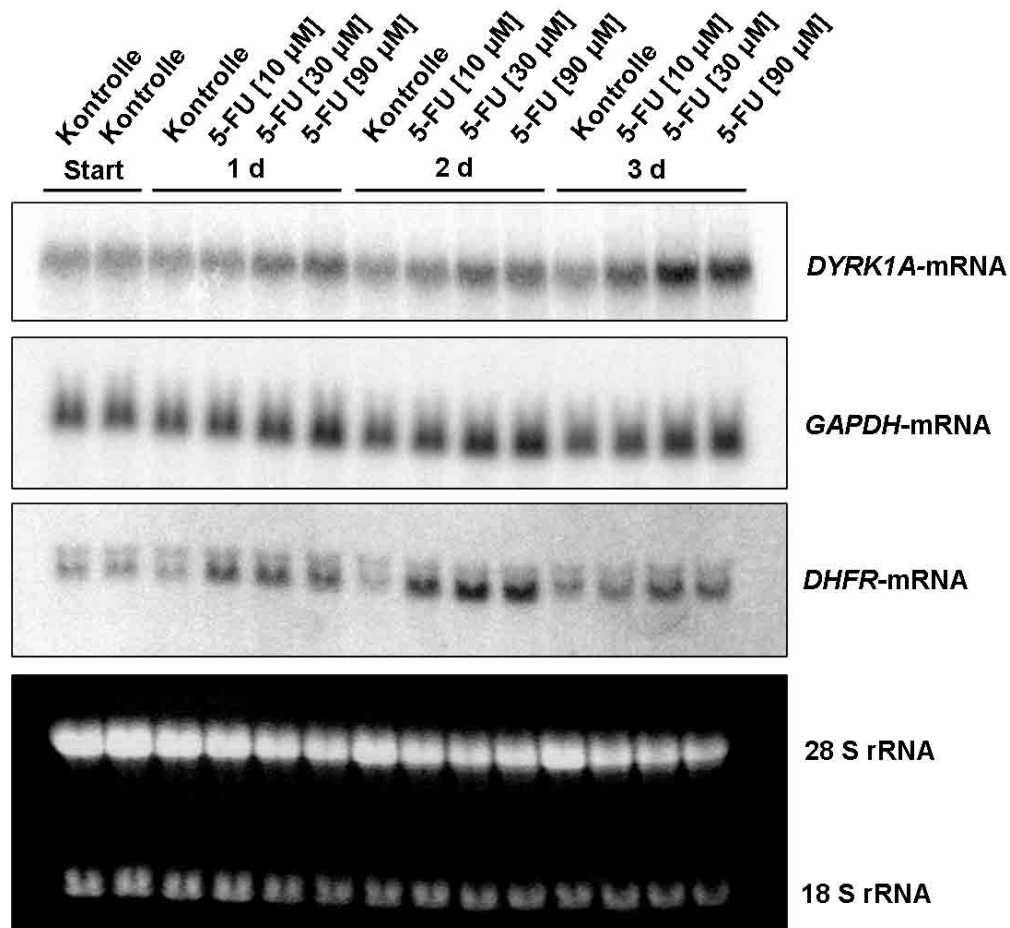


Abb. 3.12: Hochregulation der *DYRK1A*- und der Dihydrofolatreduktase (*DHFR*)-Expression durch ein-, zwei- bzw. dreitägige Behandlung von PC-3-Zellen mit 5-FU

Subkonfluente PC-3-Zellen auf 10 cm-Platten wurden 1, 2 bzw. 3 Tage lang mit 5-FU [10 µM], [30 µM] bzw. [90 µM] oder DMSO (Kontrolle) in Normalmedium behandelt. Nach 2 Tagen wurde das Normalmedium mit 5-FU bzw. DMSO (s. o.) erneuert. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde ein *Northern blot* angefertigt. Gezeigt sind die Hybridisierungen des *Northern blots* mit *DYRK1A*-, *GAPDH*- bzw. *DHFR*-cDNA (Positivkontrolle) sowie die Ethidiumbromidfärbung (unten), die – wie die *GAPDH*-mRNA – als Ladungskontrolle diente.

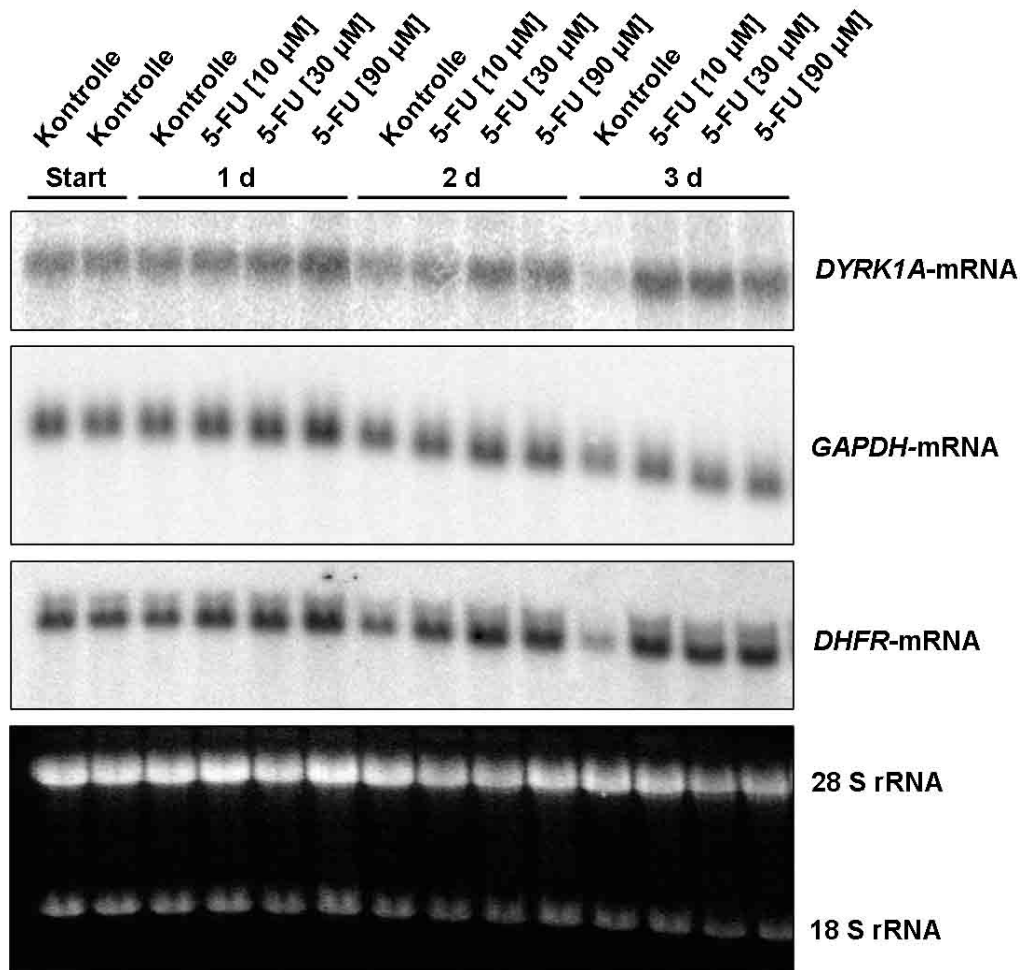


Abb. 3.13: Hochregulation der *DYRK1A*- und der Dihydrofolatreduktase (*DHFR*)-Expression durch ein-, zwei- bzw. dreitägige Behandlung von PhoenixTM-Zellen mit 5-FU

Subkonfluente PhoenixTM-Zellen auf 10 cm-Platten wurden 1, 2 bzw. 3 Tage lang mit 5-FU [10 µM], [30 µM] bzw. [90 µM] oder DMSO (Kontrolle) in Normalmedium behandelt. Nach 2 Tagen wurde das Normalmedium mit 5-FU bzw. DMSO (s. o.) erneuert. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde ein *Northern blot* angefertigt. Gezeigt sind die Hybridisierungen des *Northern blots* mit *DYRK1A*-, *GAPDH*- bzw. *DHFR*-cDNA (Positivkontrolle) sowie die Ethidiumbromidfärbung (unten), die – wie die *GAPDH*-mRNA – als Ladungskontrolle diente.

Die Behandlung mit 5-FU in diesen drei Konzentrationen verminderte die Zellproliferation von PC-3- und PhoenixTM-Zellen. Das Zytostatikum veränderte in zunehmender Konzentration speziell die Morphologie der PhoenixTM-Zellen: sie wurden runder und aufgebläht. Das Aussehen der PC-3-Zellen hingegen wurde wenig beeinflusst (Abb. 3.14 A und B; nur Effekte der höchsten 5-FU-Konzentration gezeigt).

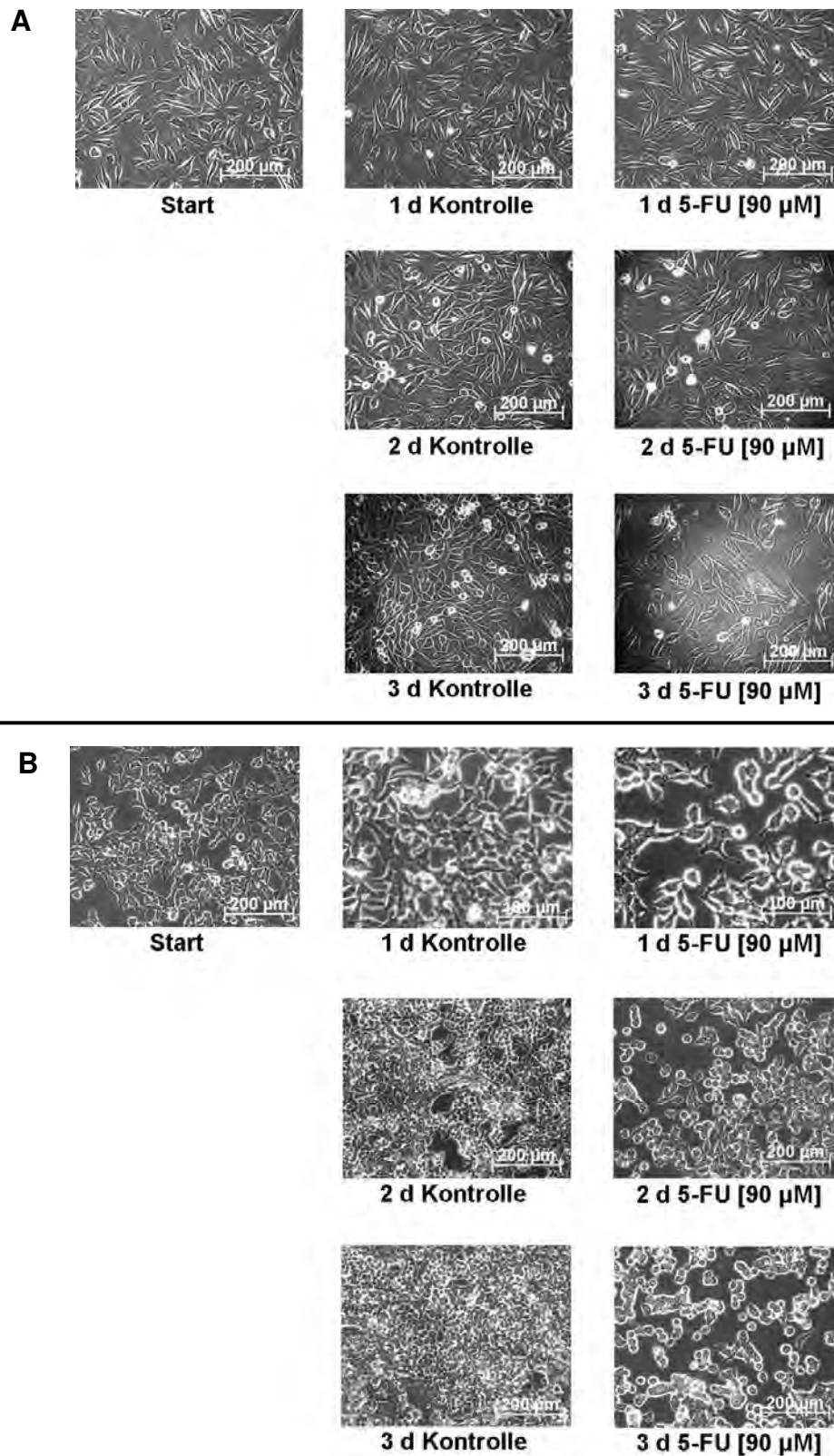


Abb. 3.14: Mikroskopische Durchlichtaufnahmen von unterschiedlich lang mit 5-FU [90 µM] bzw. Kontrolle (DMSO) behandelten PC-3- bzw. Phoenix™-Zellen

A: PC-3-Zellen.

B: Phoenix™-Zellen.

Die Gesamt-RNA dieser Zellen wurde in *Northern blots* (Abb. 3.12, Abb. 3.13) untersucht.

3.3.4 Kein Einfluss von 5-FU auf die beiden *DYRK1A*-Promotoren

Um zu klären, ob die unter 5-FU-Behandlung beobachtete erhöhte Expression von *DYRK1A* auf eine stimulierende Wirkung des Zytostatikums auf die Transkription von *DYRK1A* zurückzuführen ist, wurden Reporter-gen-Assays in PC-3- und SAOS-2-Zellen durchgeführt. In keiner der beiden Zelllinien erhöhte eine eintägige Behandlung mit 5-FU [100 µM] die Aktivität der *DYRK1A*-Promotoren A (PC-3-Zellen) bzw. B (SAOS-2- und PC-3-Zellen; Abb. 3.15; nur Daten in PC-3-Zellen gezeigt).

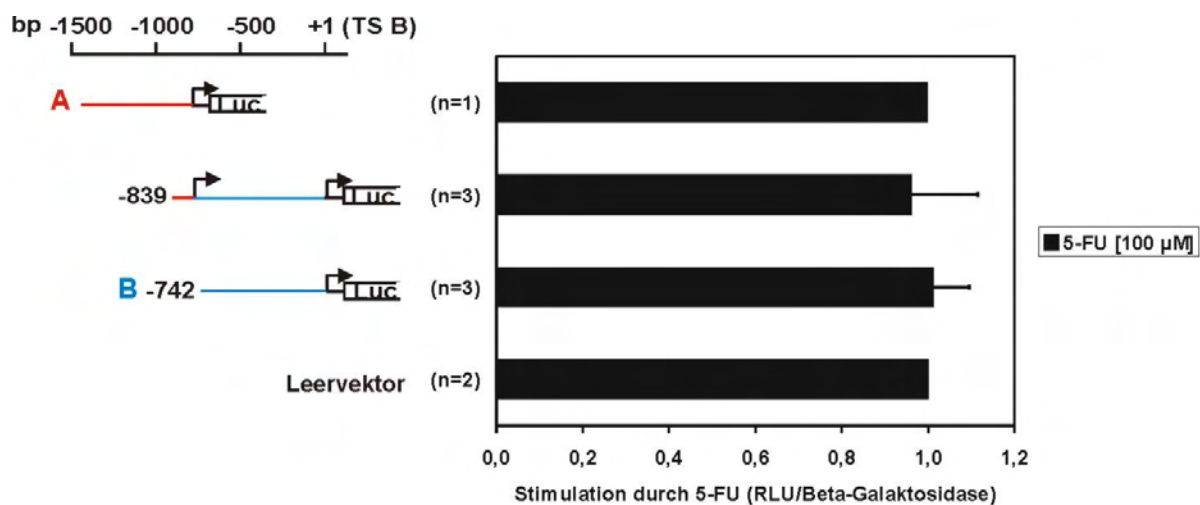


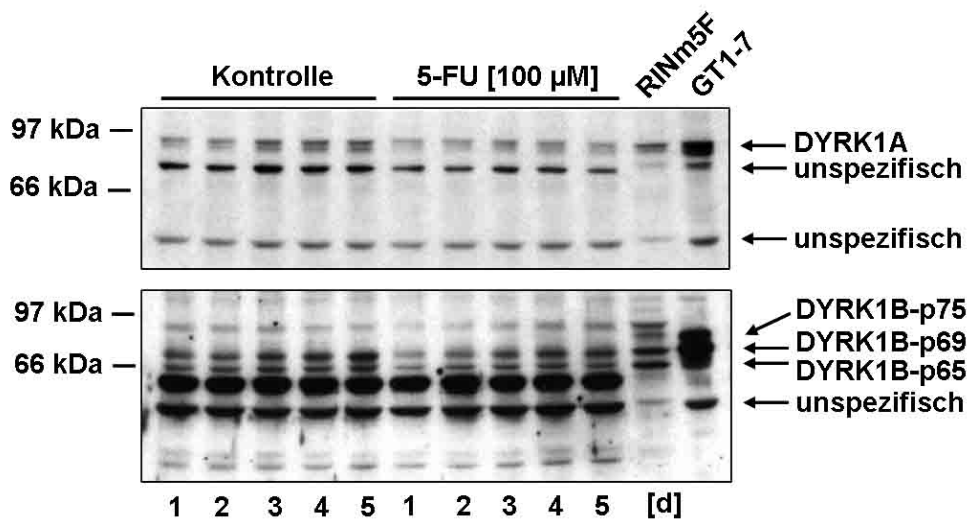
Abb. 3.15: Kein Einfluss von 5-FU auf die Aktivitäten der Promotoren A und B in PC-3-Zellen

PC-3-Zellen (200.000/6-Well) wurden am Tag nach der Aussaat mit 0,1 µg Leervektor (Kontrolle) bzw. dem angegebenen Promotorkonstrukt und 0,25 µg pSV-β-Galactosidase in je 4 Wells transient transfiziert. Am nächsten Tag wurde das Normalmedium gegen Normalmedium mit 5-FU [100 µM] bzw. Kontrolle (DMSO) ausgetauscht. Nach ca. 17 h erfolgten Lyse und Messung der RLU mit dem „Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer“. Die RLU wurden auf Beta-Galaktosidase normiert. Angegeben sind die Mittelwerte aus n unabhängigen Versuchen ± SEM (falls n > 2) bzw. ± Abweichung vom Mittelwert (falls n ≤ 2). Als Bezug diente jeweils der Mittelwert der analog transfizierten, mit DMSO (Kontrolle) behandelten Zellen.

3.3.5 Kein Anstieg der DYRK1A-Proteinmenge durch 5-FU

Die im „*Cancer Cell Line Profiling Array*“ und in *Northern blots* beobachtete Hochregulation der *DYRK1A*-mRNA durch 5-FU führte wider Erwarten nicht zu einer nachweisbaren Erhöhung der DYRK1A-Proteinmenge: sowohl in PC-3-Zellen als auch in PhoenixTM-Zellen, die im subkonfluenten Zustand mehrere Tage lang mit 5-FU [100 µM] behandelt wurden (Abb. 3.16).

A



B

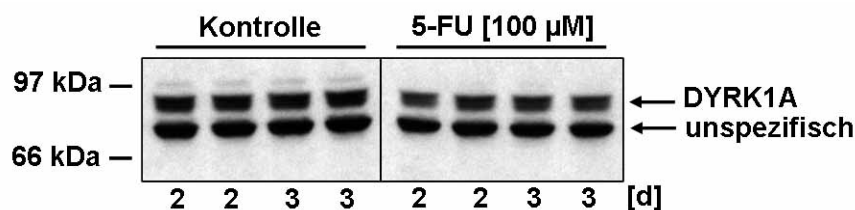


Abb. 3.16: Kein Anstieg der DYRK1A-Proteinmenge durch 5-FU [100 µM]-Behandlung von PC-3- bzw. PhoenixTM-Zellen

A: Subkonfluente PC-3-Zellen auf 6 cm-Platten wurden 5 Tage lang mit 5-FU [100 µM] bzw. DMSO (Kontrolle) behandelt. Endogene DYRK1A, DYRK1B-p65 und -p69 (zum Vergleich mit DYRK1A) in den denaturierten Lysaten wurden nach 8%-SDS-PAGE im *Western blot* analysiert. Lysate aus RINm5F- und GT1-7-Zellen dienten zur korrekten Zuordnung der Banden. DYRK1A (ca. 90 kDa) erschien als typische Doppelbande, die möglicherweise durch alternatives Spleißen (27 fehlende Nukleotide bei gleichem Translationsstart) der *DYRK1A*-Prä-mRNA zustande kommt (Kentrup *et al.*, 1996; Okui *et al.*, 1999; Shindoh *et al.*, 1996).

B: Subkonfluente PhoenixTM-Zellen auf 6 cm-Platten wurden 2 bzw. 3 Tage lang mit 5-FU [100 µM] bzw. DMSO (Kontrolle) behandelt. Nach 2 Tagen wurde das Normalmedium mit 5-FU bzw. DMSO (s. o.) erneuert. Endogene DYRK1A in den denaturierten Lysaten wurde nach 8%-SDS-PAGE im *Western blot* analysiert.

Nach dreitägiger Behandlung fast konfluenten PC-3-Zellen mit 5-FU [100 μ M] ließ sich in den entsprechenden denaturierten Lysaten ebenfalls keine erhöhte DYRK1A- bzw. DYRK1B-Biosyntheserate im *Western blot* nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Auch in PhoenixTM-Zellen, die nach fünftägigem Wachstum vollkommen konfluent gewachsen waren, dann in 1/5 ihrer Dichte replattiert und zwei Tage lang mit 5-FU [100 μ M] behandelt worden waren, ließ sich keine Hochregulation der DYRK1A-Proteinmenge im *Western blot* nachweisen (Daten nicht gezeigt). Ein Zeichen für die Wirksamkeit von 5-FU war ein deutlich erhöhter Gehalt der Zellen an phosphoryliertem Transkriptionsfaktor Rb (Retinoblastom-Protein), einem Marker für die frühe S-Phase des Zellzyklus (Abb. 3.17).

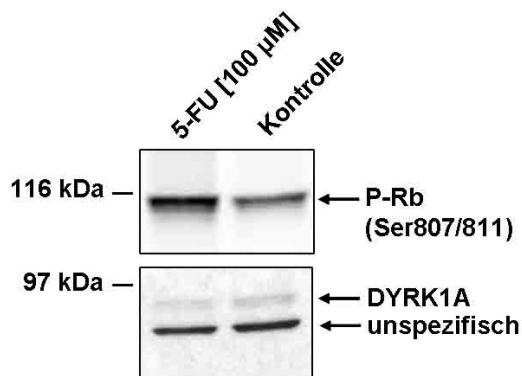


Abb. 3.17: DYRK1A- und Phospho-Rb-Protein nach 5-FU [100 μ M]-Behandlung von PhoenixTM-Zellen

Voll konfluente PhoenixTM-Zellen auf 6 cm-Platten wurden in 1/5 ihrer Dichte replattiert und 8 h später mit DMSO (Kontrolle) bzw. 5-FU [100 μ M] behandelt. Nach 2 Tagen wurden die Zellen denaturierend lysiert. Nach 8%-SDS-PAGE wurden endogene DYRK1A und das als S-Phasen-Marker dienende Phospho-Rb-Protein (P-Rb, Ser807/811-phosphoryliertes Retinoblastom-Protein) im *Western blot* analysiert.

Im „*Cancer Cell Line Profiling Array*“ zeichnete sich die humane Zervixkarzinomzelllinie HeLa durch eine eher geringe Expression des *DYRK1A*-Gens aus, welche auch nicht durch zweitägige Behandlung mit 5-FU [80 μ M] hochreguliert wurde (Abb. 3.10, unten). Eine eintägige, hochdosierte 5-FU-Behandlung [200 μ M] führte ebenfalls nicht zu einem im *Western blot* nachweisbaren Anstieg der DYRK1A-Proteinmenge (Daten nicht gezeigt).

3.4 *DYRK1A*- und *TP53*-Status humaner Tumorzelllinien

Der „*Cancer Cell Line Profiling Array*“ ließ vermuten, dass die *DYRK1A*-Expression in Tumorzelllinien erhöht ist, denen das regulatorische Protein p53 (Synonym: TP53) fehlt, das z. B. an apoptotischen Vorgängen beteiligt ist. Im Vergleich aller unbehandelten Zelllinien des *Arrays* exprimierte z. B. die Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 (*TP53* -/-), deren *TP53* durch homologe Rekombination ausgeschaltet wurde (Bunz *et al.*, 1998), mehr *DYRK1A* als HCT116-Zellen mit p53-Wildtyp. Auch in der p53-defizienten Prostataadenokarzinom-Zelllinie PC-3 wurde mehr *DYRK1A* transkribiert als z. B. in der Prostatakarzinomzelllinie DU 145, die p53 synthetisiert. Betrachtete man allerdings die Lungenkarzinom-Zelllinie NCI-H1299 und die Ovaradenokarzinom-Zelllinie SK-OV-3, denen p53 fehlt, so fiel keine erhöhte *DYRK1A*-Genexpression auf.

Um zu ergründen, ob eine Korrelation zwischen *TP53*-Mangel und erhöhter *DYRK1A*-Genexpression besteht, wurden die Aktivitäten der *DYRK1A*-Promotoren in PC-3-Zellen mit denen *TP53* überexprimierender PC-3-Zellen in Reporter-gen-Assays verglichen. Bei *TP53*-Überexpression war *DYRK1A*-Promotor A nur noch etwa halb so aktiv wie in p53-negativen PC-3-Zellen. Promotor B war in *TP53* überexprimierenden PC-3-Zellen sogar nur noch ca. 36% so aktiv wie in PC-3-Zellen, die mit dem entsprechenden Leervektor transient transfiziert worden waren (Abb. 3.18 A). Die p53-Überexpression wurde im *Western blot* kontrolliert (Abb. 3.18 B). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass zumindest in manchen Tumorgeweben eine Korrelation zwischen *TP53*-Mangel und starker *DYRK1A*-Expression besteht.

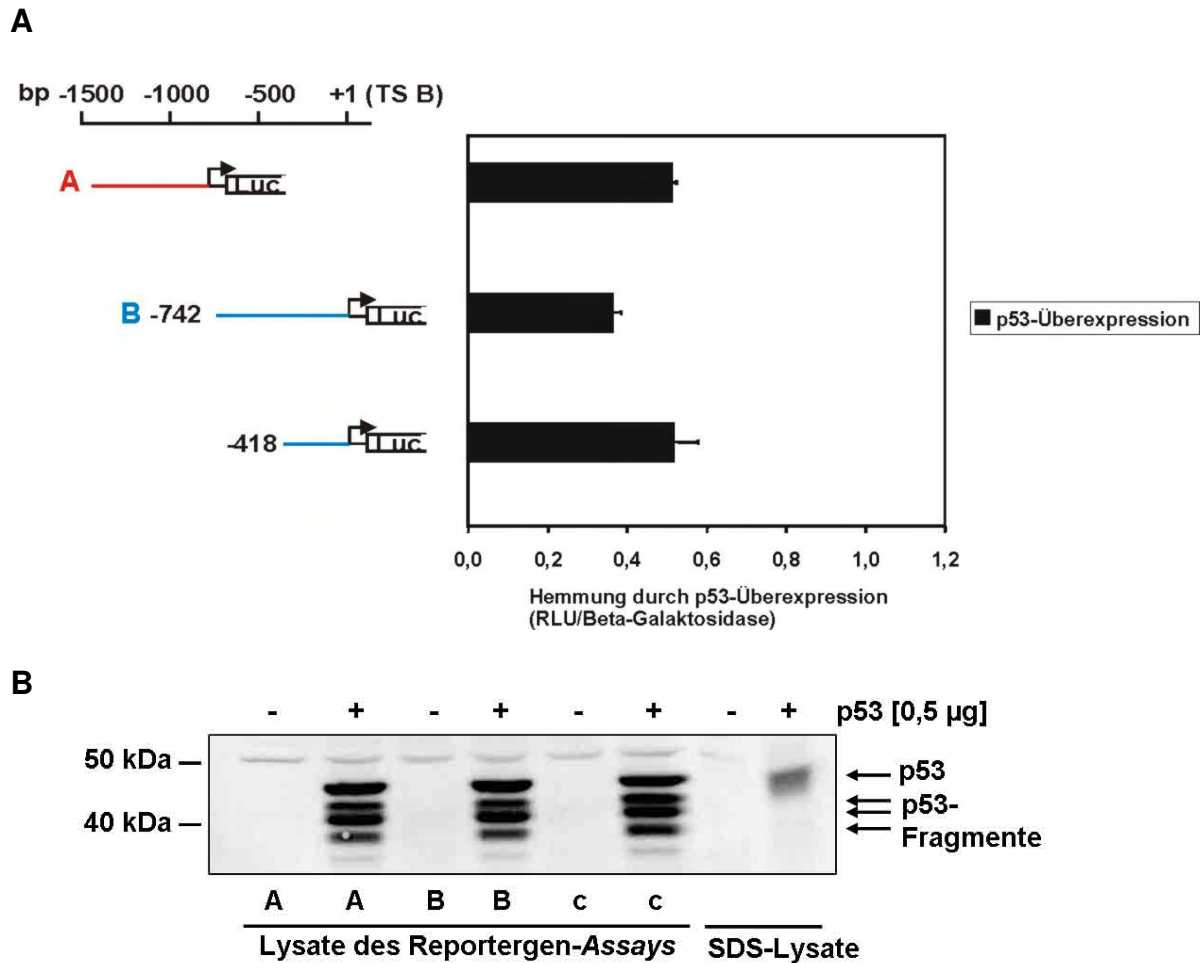


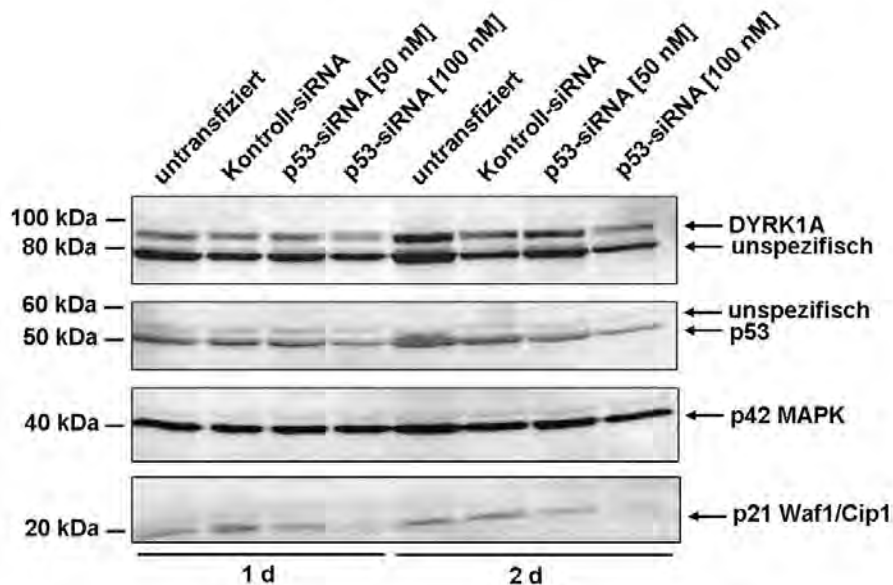
Abb. 3.18: Verminderte Aktivitäten der *DYRK1A*-Promotoren A und B in *TP53* überexprimierenden PC-3-Zellen

A: PC-3-Zellen (200.000/6-Well) wurden am Tag nach der Aussaat mit 0,1 µg des angegebenen Promotorkonstruktes, 0,5 µg pCMV•SPORT6-TP53 (RZPD, Berlin; GenBank®-Nr. BI832654) bzw. 0,5 µg pCMV•SPORT6 (Invitrogen, Karlsruhe) und 0,25 µg pSV-β-Galactosidase in je 2 Wells transient transfiziert. Nach 2 Tagen erfolgten Lyse und Messung der RLU mit dem „Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer“. Die RLU wurden auf Beta-Galaktosidase normiert. Angegeben sind die Mittelwerte eines Versuches ± Abweichung der beiden Messwerte vom Mittelwert. Als Bezug diente jeweils der Mittelwert der Zellen, die mit 0,1 µg des angegebenen Promotorkonstruktes, 0,5 µg pCMV•SPORT6 (Leervektor) und 0,25 µg pSV-β-Galactosidase in je 2 Wells transient transfiziert worden waren (Kontrolle, d. h. *TP53*-Mangel).

B: Aliquots der in A beschriebenen Lysate und von denaturierten Lysaten aus PC-3-Zellen, die mit 0,5 µg pCMV•SPORT6-TP53 bzw. 0,5 µg pCMV•SPORT6 transient transfiziert und zwei Tage später lysiert worden waren, wurden in einer 10%-SDS-PAGE aufgetrennt. Die p53-Überexpression wurde im Western blot kontrolliert. A: Promotor A; B: Promotor B; c: pGL3-hDYRK1A-418. Nach der Lyse mit „Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer“ lag ein Teil des überexprimierten p53 fragmentiert vor.

Der Einfluss des *TP53*-Status auf die DYRK1A-Proteinmenge wurde in HeLa-Zellen, einer humanen, gut transfizierbaren und p53-positiven Zervixkarzinom-Zelllinie untersucht. Die starke Herunterregulation der *TP53*-Expression durch RNA-Interferenz, die durch Herunterregulation des p53-Targets p21 Waf1/Cip1 kontrolliert wurde, zog wider Erwarten keinen im *Western blot* nachweisbaren Anstieg der DYRK1A-Synthese nach sich (Abb. 3.19).

A



B

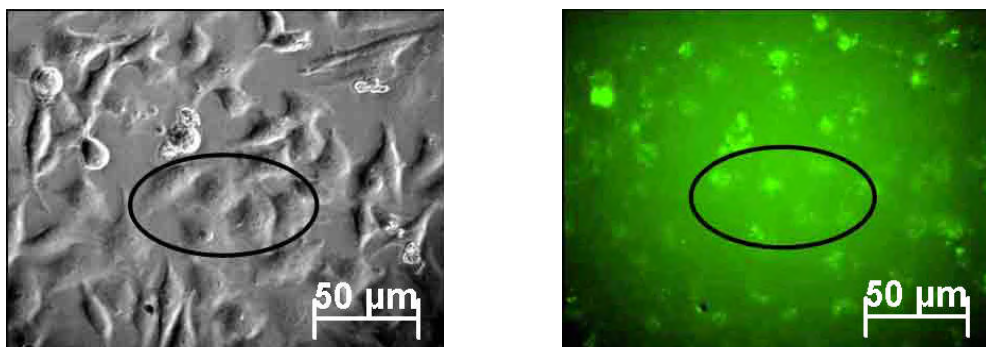


Abb. 3.19: Kein Anstieg der DYRK1A-Proteinmenge bei reduzierter *TP53*-Expression in HeLa-Zellen

A: HeLa-Zellen (80.000 bzw. 100.000 (Spur 5)/12-Well) wurden am Tag nach der Aussaat (ca. 60% Konfluenz) nicht transfiziert oder mit Fluorescein-gekoppelter, unspezifischer Kontroll-siRNA [100 nM] bzw. p53-siRNA [50 nM]/[100 nM] („*SignalSilenceTM p53 siRNA Kit (Human Specific)*“) transient transfiziert. Nach 1 bis 2 Tagen wurden die Zellen denaturierend in 1xLSB/DTT lysiert. DYRK1A, p53 und p21 wurden nach 10%-SDS-PAGE im *Western blot* analysiert. p42 MAPK diente als Ladungskontrolle und zur Kontrolle der Spezifität der p53-siRNA.

B: HeLa-Zellen (150.000/12-Well) wurden am Tag nach der Aussaat mit Fluorescein-gekoppelter Kontroll-siRNA [100 nM] transient transfiziert und einen Tag später mikroskopiert (Transfektions-effizienz). Links: Durchlichtaufnahme, rechts: Fluorescein-Fluoreszenz-Aufnahme.

3.5 Auswirkungen der Zellzyklus-aktiven Substanzen Aphidicolin, Nocodazol und Lovastatin auf die *DYRK1A*-mRNA

Da der Antimetabolit 5-FU, der den Zellzyklus in der S-Phase anhält, die *DYRK1A*-Genexpression in PC-3- und PhoenixTM-Zellen hochregulierte (s. S. 76 - 79), war nun von Interesse, ob dieser Effekt auch durch Behandlung von PC-3-Zellen mit den in den Zellzyklus eingreifenden Substanzen Aphidicolin, Nocodazol bzw. Lovastatin (Abb. 3.20) erzielt wird.

Aphidicolin hält den Zellzyklus in der frühen S-Phase an, indem es – unabhängig vom p53- bzw. p21 Waf1/Cip1-Status der Zelle – die DNA-Polymerase A und damit die DNA-Replikation inhibiert. Nocodazol (auch Onkodazol genannt) hält dagegen den Zellzyklus am G₂/M-Phasen-Übergang an, indem es die Dynamik der Mikrotubuli hemmt, und induziert in mehreren normalen Zelllinien und Tumorzelllinien Apoptose. Das Statin Lovastatin (Mevinolin) kommt als Metabolit in *Aspergillus*-Spezies vor und hemmt die HMG-CoA-Reduktase, weshalb es gegen Hypercholesterinämie eingesetzt wird. Es kann den Zellzyklus in der G₁-Phase bzw. am G₂/M-Phasen-Übergang arretieren, unabhängig vom p53-, Rb-, p21- und p27-Status der Zelle. In Tumorzelllinien, z. B. in PC-3-Zellen, induziert Lovastatin Apoptose, möglicherweise aufgrund einer Hemmung der Isoprenylierung von Proteinen.

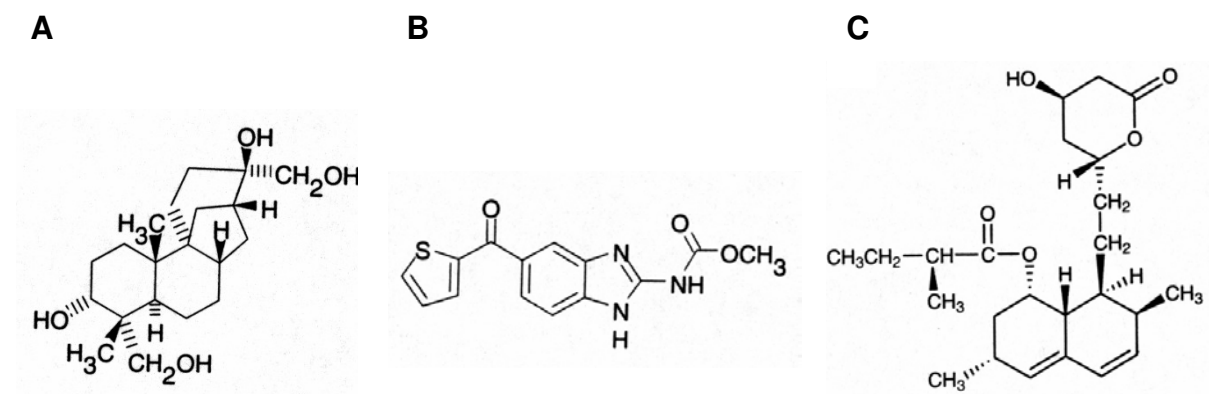


Abb. 3.20: Strukturformeln von Aphidicolin (A), Nocodazol (B) und Lovastatin (C)

In zu 60% konfluenten PC-3-Zellen regulierte Aphidicolin [10 µM] innerhalb von zwei Tagen die im *Northern blot* nachweisbare *DYRK1A*-Expression nicht hoch (Abb. 3.21 A). Unter eintägiger Nocodazol [0,25 µg/ml]-Behandlung blieb die *DYRK1A*-mRNA-

Menge konstant, wohingegen sie nach zwei Tagen Lovastatin [10 μ M] geringfügig hochreguliert wurde (Abb. 3.21 A). Nocodazol löste bereits nach einem Tag ca. die Hälfte der PC-3-Zellen von der Platte ab, sodass die RNA-Isolierung aller mit Nocodazol behandelten Zellen schon nach einem Tag erfolgte. Lovastatin ließ die PC-3-Zellen klein und spindelförmig bis rundlich werden und löste ebenfalls ca. 50% der Zellen von der Platte ab. Auch in diesem Fall wurde die RNA aller Zellen isoliert.

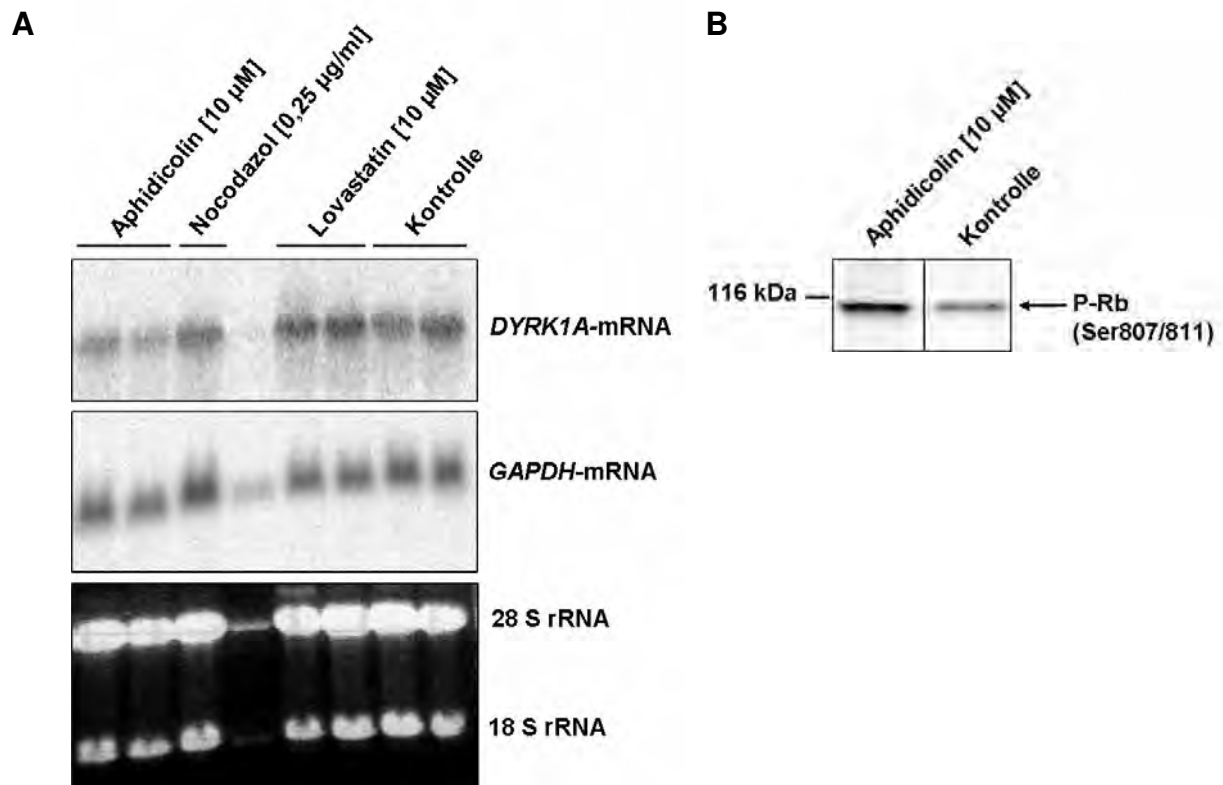


Abb. 3.21: Regulation der *DYRK1A*-Expression in PC-3-Zellen durch Nocodazol, Aphidicolin bzw. Lovastatin

A: Subkonfluente PC-3-Zellen auf 10 cm-Platten wurden einen Tag lang mit Nocodazol [0,25 μ g/ml] bzw. 2 Tage lang mit Aphidicolin [10 μ M], Lovastatin [10 μ M] bzw. DMSO (Kontrolle) in Normalmedium behandelt. Gezeigt sind die *DYRK1A*- und *GAPDH*-cDNA-Hybridisierungen des *Northern blots* mit Gesamt-RNAs eines Versuchs mit je zwei identisch behandelten Platten sowie die Ethidiumbromidfärbung (unten), die – wie die *GAPDH*-mRNA – als Ladungskontrolle diente. Bei „Nocodazol“ war nur eine Bande jeder Hybridisierung auswertbar.

B: Voll konfluente PhoenixTM-Zellen in 6-*Wells* wurden in 1/5 ihrer Dichte replattiert und nach 8 h mit Aphidicolin [10 μ M] bzw. DMSO (Kontrolle) behandelt. Nach zwei Tagen wurden die Zellen denaturierend lysiert. Nach 8%-SDS-PAGE wurde das als S-Phasen-Marker dienende Phospho-Rb-Protein (P-Rb, Ser807/811-phosphoryliertes Retinoblastom-Protein) im *Western blot* analysiert.

Die Tatsache, dass sich unter der Nocodazol- bzw. Lovastatin-Behandlung etwa die Hälfte aller PC-3-Zellen von den Platten ablöste, deutet auf Apoptose hin und bestätigte die Wirksamkeit dieser Substanzen in den gewählten Konzentrationen. Die erhöhte Syntheserate des S-Phasenmarkers Rb in PhoenixTM-Zellen (Abb. 3.21 B) zeugte von der Wirksamkeit des Aphidicolins, das die Zellen kugelförmig und aufgebläht werden ließ und sie zu „verketteten“ schien.

3.6 *DYRK1A* – ein *Target*-Gen des Transkriptionsfaktors E2F1?

3.6.1 Hochregulation der *DYRK1A*-Expression durch exogenes E2F1

Der Transkriptionsfaktor E2F1 bindet als Heterodimer mit DP1 (*E2F Dimerisation Partner 1*) an DNA mit der Konsensussequenz 5'-TTT(C/G)(G/C)CG(C/G)-3' und vermittelt den Übergang der G₁- in die S-Phase des Zellzyklus, d. h. Zellproliferation. E2F1 kann aber auch Apoptose auslösen. Ob E2F1 als Onkoprotein oder Tumorsuppressorprotein fungiert, hängt wahrscheinlich vom zellulären Kontext ab. In gesunden Zellen wird das Retinoblastom-Protein Rb in der späten G₁-Phase des Zellzyklus durch den aktiven CDK2/Cyclin E-Komplex mehrfach phosphoryliert, woraufhin es nicht mehr an seinen Bindungspartner E2F1 bindet. Nur der freie, nicht an Rb gebundene Transkriptionsfaktor E2F1 ist aktiv: er reguliert als Heterodimer mit dem Transkriptionsfaktor DP1 die Transkription von Genen hoch, die Enzyme der DNA-Synthese kodieren, sodass der Übergang von der G₁- in die S-Phase gewährleistet ist.

Tritt jedoch ein DNA-Schaden auf, wird die *TP53*-Expression hochreguliert. Der Transkriptionsfaktor p53 wiederum stimuliert die *TP21*-Expression. Das Protein p21 inaktiviert den CDK2/CyclinE-Komplex, sodass die oben beschriebene Signalkaskade des G₁-/S-Phasen-Übergangs unterbrochen wird, d. h. es kommt zum Stillstand des Zellzyklus am Kontrollpunkt zwischen G₁- und S-Phase bzw. zu Apoptose.

In *Microarrays* wiesen Müller und Kollegen (2001) in U2OS-Zellen (humane Osteosarkom-Zelllinie) bzw. Ma und Kollegen (2002) in NIH-3T3-Fibroblasten (Maus-Zelllinie), die in der G₀-Phase des Zellzyklus E2F1 durch adenovirale Infektion überexprimierten und 30 h später in die S-Phase eintraten, eine 4,3-fache bzw. 3,3-fache

Hochregulation der *DYRK1A*-mRNA durch den überexprimierten Transkriptionsfaktor E2F1 nach.

Da die Nukleotidsequenz des *DYRK1A*-Promotors B mit 5'-TTTGCCGG-3' bei -153 bp bzw. 5'-TGCCGG-3' bei -33 bp zwei mögliche E2F1-Bindungsstellen aufweist (Abb. 3.1), wurde zunächst in *Northern blots* untersucht, ob überexprimiertes E2F1 die *DYRK1A*-Genexpression in SAOS-2- bzw. PhoenixTM- Zellen hochreguliert. Die eingesetzten SAOS-2-Zellen exprimieren ein Tet-On-System (Gossen & Bujard, 1992) für E2F1, d. h. die *E2F1*-Expression war aufgrund eines stabil exprimierten, Doxycyclin-responsiven Promotors mit Doxycyclin induzierbar (Bates *et al.*, 1998) (Abb. 3.22). Mit diesem Tet-On-System ließ sich die Induktion des *E2F1*-Gens sowohl zeitlich als auch quantitativ steuern.

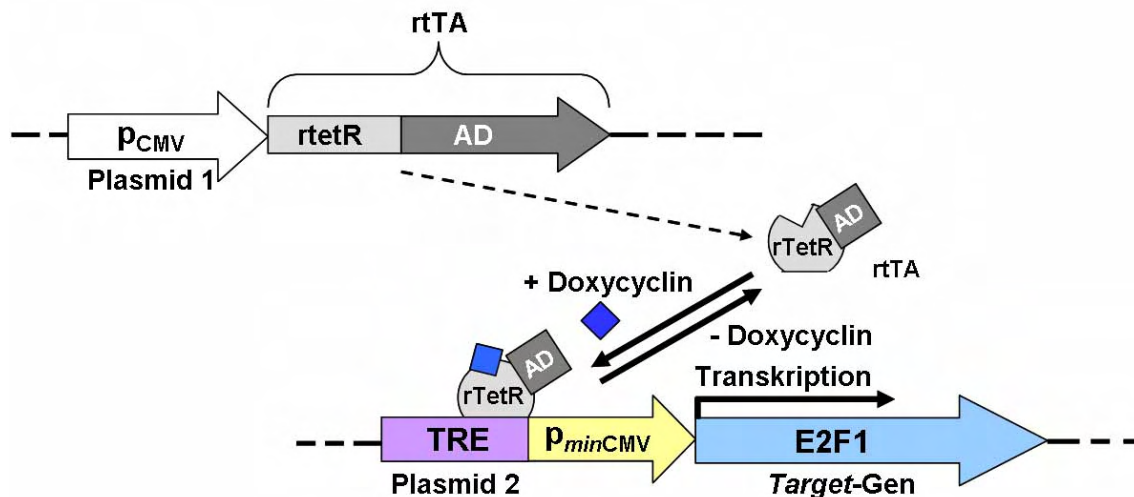


Abb. 3.22: Schema des Tet-On-Systems für E2F1 in SAOS-2-Zellen

pCMV: CMV (Cytomegalie-Virus)-Promotor; *min*: minimal (ohne Enhancer); rTetR: reverses Tet-Repressorprotein (bindet nur in Anwesenheit von Doxycyclin an das TRE); AD: VP16-Aktivierungsdomäne des Herpes simplex-Virus; rtTA: reverser Tet-kontrollierter Transaktivator; TRE: Tetracyclin-responsives Promotorelement (steuert in Tetracyclin-resistenten *E. coli* die Expression des Tetracyclin-Resistenzgens).

In einem WST-Assay wurde die Toxizität des Doxycyclins in den SAOS-2-Zellen untersucht. Diese Zelllinie vertrug problemlos eine Doxycyclindosis von 2 µg/ml, die daher in den folgenden Experimenten eingesetzt wurde (Abb. 3.23 bis Abb. 3.27).

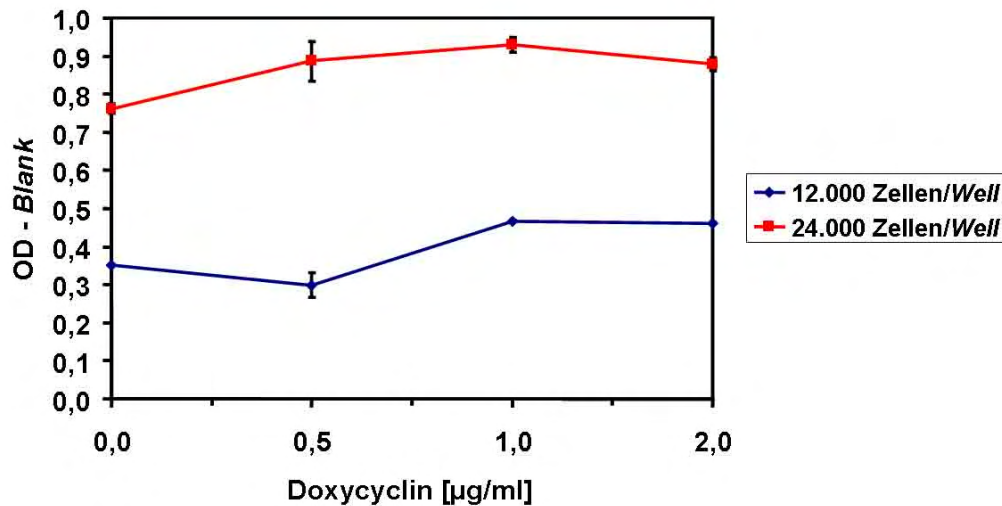


Abb. 3.23: WST-Assay zur Überprüfung der Toxizität von Doxycyclin in SAOS-2-Zellen

SAOS-2-Zellen (12.000 bzw. 24.000/96-Well) wurden einen Tag nach der Aussaat ca. 17 h lang mit Doxycyclin [0,5 µg/ml], [1 µg/ml], [2 µg/ml] bzw. A. bidest. (Kontrolle) in Normalmedium behandelt. Nach ca. 2,5-stündiger Inkubation mit WST-1/ECS bei 37°C/5% CO₂ wurde die OD photometrisch bestimmt. Normalmedium (100 µl) diente als Hintergrund (*Blank*). Die OD - *Blank*-Werte waren ein Maß für die Lebensfähigkeit („Viabilität“/Proliferation) der Zellen.

In SAOS-2-Zellen rief eine 18-stündige Behandlung mit Doxycyclin [2 µg/ml] eine ca. 1,6-fache Hochregulation der *DYRK1A*-mRNA hervor (Abb. 3.24 A). Dass Doxycyclin [2 µg/ml] hier tatsächlich die E2F1-abhängige Genexpression hochregulierte, wurde an der (geringen) Hochregulation des E2F1-*Target*-Gens *DHFR* deutlich (Abb. 3.24 A). Innerhalb von zwei Tagen regulierte der transient überexprimierte Transkriptionsfaktor E2F1 auch in PhoenixTM-Zellen die *DYRK1A*-Expression hoch (Abb. 3.24 B).

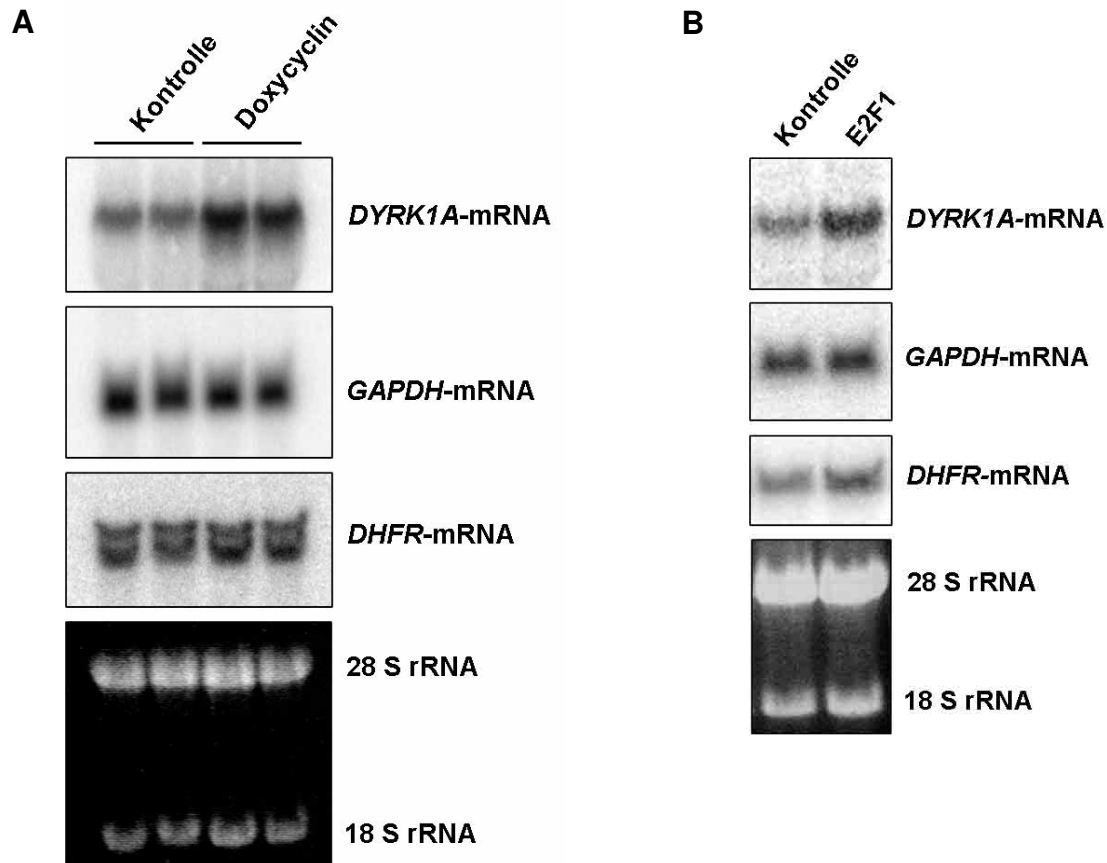


Abb. 3.24: Hochregulation der *DYRK1A*- und der Dihydrofolatreduktase (*DHFR*)-Expression durch den überexprimierten Transkriptionsfaktor E2F1 in SAOS-2- bzw. PhoenixTM-Zellen

A: SAOS-2-Zellen (270.000/10 cm-Platte) wurden bei ca. 75% Konfluenz 18 h lang mit Doxycyclin [2 µg/ml] bzw. A. bidest. (Kontrolle) in Normalmedium behandelt. Nach Isolierung der Gesamt-RNA dieses repräsentativen Versuches mit je zwei identisch behandelten Platten wurde ein *Northern blot* angefertigt. Gezeigt sind die Hybridisierungen des *Northern blots* mit *DYRK1A*-, *GAPDH*- bzw. *DHFR*-cDNA sowie die Ethidiumbromidfärbung (unten), die – wie die *GAPDH*-mRNA – als Ladungskontrolle diene.

B: PhoenixTM-Zellen (500.000/10 cm-Platte) wurden bei ca. 75% Konfluenz mit 2 µg pCMV•SPORT6-E2F1 (RZPD, Berlin; GenBank[®]-Nr. BC050369) und 1 µg pEGFP-C1 (Clontech, Palo Alto, USA) bzw. nur mit 1 µg pEGFP-C1 (Kontrolle der Transfektionseffizienz) transient transfiziert. Zwei Tage später wurde die Gesamt-RNA dieses repräsentativen Versuches isoliert und ein *Northern blot* angefertigt. Gezeigt sind die Hybridisierungen des *Northern blots* mit *DYRK1A*-, *GAPDH*- bzw. *DHFR*-cDNA sowie die Ethidiumbromidfärbung (unten), die – wie die *GAPDH*-mRNA – als Ladungskontrolle diene.

Da die Nukleotidsequenz des *DYRK1A*-Promotors B, wie bereits erwähnt, zwei mögliche Bindungsstellen für E2F1 aufweist und die Expression des *DYRK1A*-Gens in zwei Zelllinien durch E2F1 hochreguliert wurde (s. o.), sollten nun Reporter-gen-

Assays Aufschluss über eine mögliche Stimulation des *DYRK1A*-Promotors B durch den Transkriptionsfaktor E2F1 geben. Die Aktivität der 418 bp langen Region *upstream* von Transkriptionsstart B, in der beide mutmaßlichen E2F1-Bindungsstellen liegen (Abb. 3.1), stieg in SAOS-2-Zellen mit zunehmender E2F1-Menge (Abb. 3.25). In Reporter-gen-Assays und *Northern blots* wurde Doxycyclin in einer Konzentration von 2 µg/ml (Plateauphase in Abb. 3.25) zur gezielten *E2F1*-Überexpression mit Hilfe des Tet-On-Systems in SAOS-2-Zellen eingesetzt.

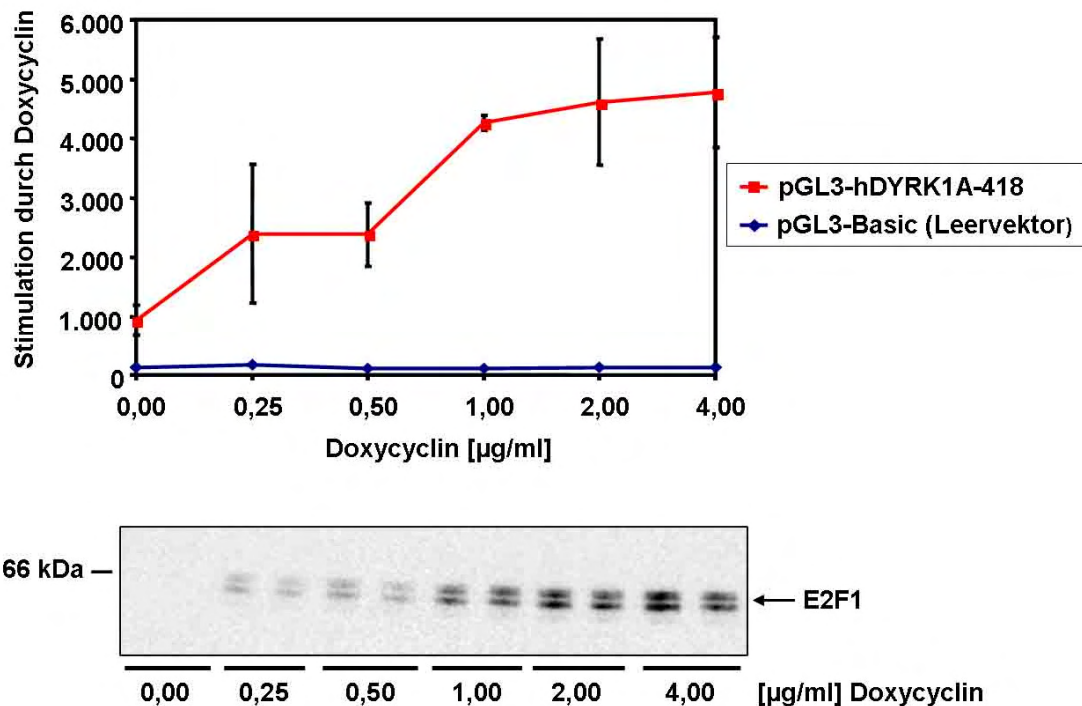


Abb. 3.25: Stimulation der Aktivität des 418 bp langen 5'-Deletionsfragmentes des *DYRK1A*-Promotors B durch Doxycyclin-induziertes E2F1 in SAOS-2-Zellen

SAOS-2-Zellen (152.000/6-Well) waren zwei Tage nach der Aussaat ca. 75% konfluent und wurden mit 0,1 µg pGL3-hDYRK1A-418 bzw. 0,1 µg pGL3-Basic (Kontrolle) in je 12 Wells transient transfiziert. Ca. 5 h später wurden die Zellen mit PBS (37 °C) gewaschen und ca. 17 h lang mit Doxycyclin in den angegebenen Dosen bzw. A. bidest. (Kontrolle) in Normalmedium behandelt. Lyse und Messung der RLU erfolgten mit dem „Dual-Luciferase® Reporter Assay System“. Da die Gesamtproteinbestimmung durch den PLB-Lysepuffer gestört wurde, wurden die RLU-Werte nicht auf Gesamtprotein normiert. Oben: angegeben sind die RLU-Mittelwerte eines Versuches ± Abweichung der beiden Messwerte vom Mittelwert; unten: durch Doxycyclin induziertes E2F1 in den Lysaten des Reporter-gen-Assays im Western blot.

Reporter-Gen-Assays in SAOS-2-Zellen zeigten, dass durch Doxycyclin induziertes E2F1 ausschließlich *DYRK1A*-Promotor B und dessen 5'-Deletionsfragmente aktivierte, die geringere Basalaktivitäten als Promotor A und die Konstrukte mit beiden Transkriptionsstarts besaßen (Abb. 3.26, Abb. 3.27 A und B).

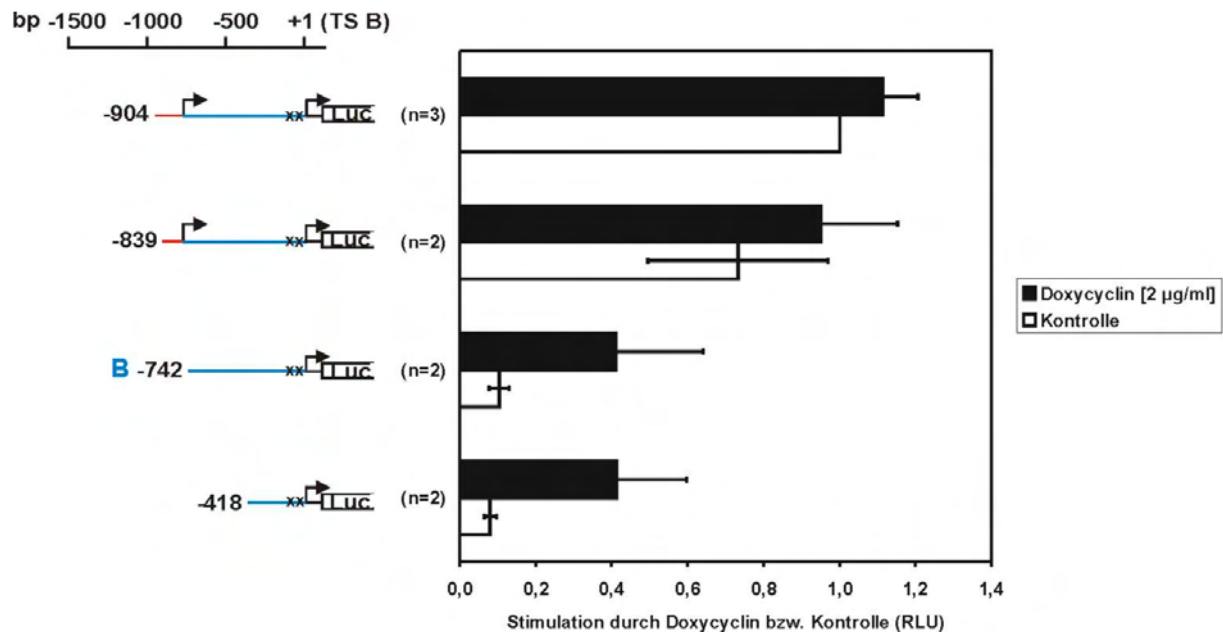


Abb. 3.26: Aktivierung des *DYRK1A*-Promotors B und eines seiner 5'-Deletionsfragmente durch Doxycyclin-induziertes E2F1 in SAOS-2-Zellen

SAOS-2-Zellen (200.000/6-Well; Ausnahme: in einem Versuch 152.000 Zellen/6-Well) wurden im subkonfluenten Zustand mit 0,1 µg des angegebenen Promotorkonstruktes in je 4 Wells transient transfiziert. Ca. 5 h später wurden die Zellen mit PBS (37°C) gewaschen und ca. 17 h lang mit Doxycyclin [2 µg/ml] bzw. A. bidest. (Kontrolle) in Normalmedium behandelt. Lyse und Messung der RLU erfolgten mit dem „Dual-Luciferase® Reporter Assay System“. Da die Gesamtproteinbestimmung durch den PLB-Lysepuffer gestört wurde, wurden die RLU-Werte nicht auf Gesamtprotein normiert. Angegeben sind die Mittelwerte aus n unabhängigen Versuchen ± SEM (falls n > 2) bzw. ± Abweichung vom Mittelwert (falls n = 2). Als Bezug diente in jedem Versuch der Mittelwert der mit pGL3-hDYRK1A-904 transfizierten, mit A. bidest. (Kontrolle) behandelten Zellen. Die mutmaßlichen E2F1-Bindungsstellen sind als schwarze Kreuze dargestellt.

Der überexprimierte Transkriptionsfaktor E2F1 stimulierte die Aktivitäten der beiden kürzesten Promotorfragmente sogar 2,5-fach in Bezug auf die Kontrolle, was auf eine mögliche E2F1-Bindung innerhalb -226 bp hindeutete (Abb. 3.27). Da die Beta-Galaktosidasewerte unter der Doxycyclin-Behandlung teilweise stark sanken, während die Gesamtproteinmenge recht konstant blieb, erfolgte eine Normierung der RLU-Werte auf Gesamtprotein. Abb. 3.27 B zeigt zum Vergleich die Auswertung dieser Versuchsreihe mit den auf Beta-Galaktosidase bezogenen RLU-Werten.

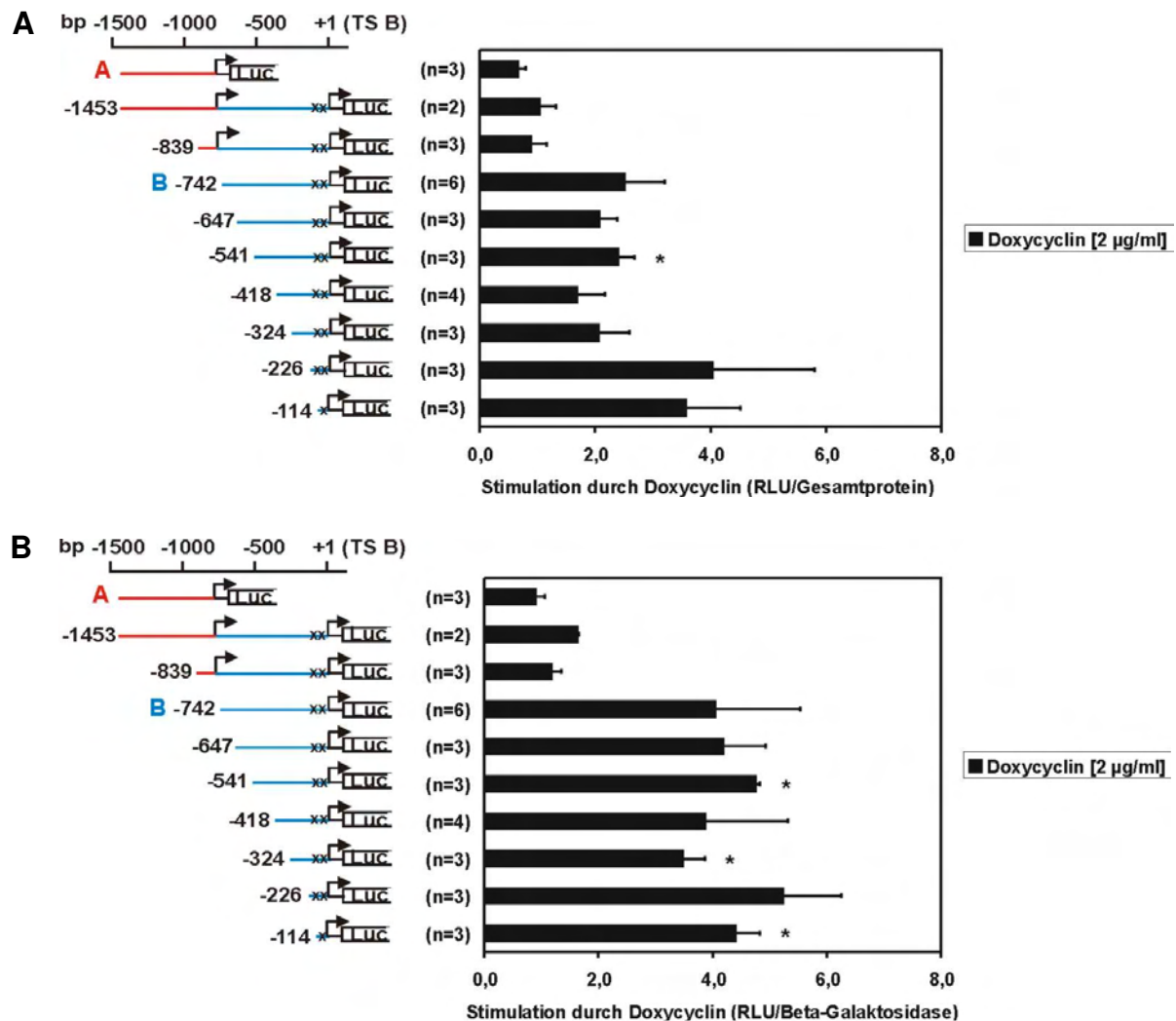


Abb. 3.27: Aktivierung des *DYRK1A*-Promotors B und dessen 5'-Deletionsfragmenten durch Doxycyclin-induziertes E2F1 in SAOS-2-Zellen

A: SAOS-2-Zellen (200.000/6-Well) wurden am Tag nach der Aussaat mit 0,1 µg des angegebenen Promotorkonstruktes und 0,25 µg pSV-β-Galactosidase in je 4 Wells transient transfiziert. Ca. 5 h später wurden die Zellen mit PBS (37°C) gewaschen und ca. 17 h lang mit Doxycyclin [2 µg/ml] bzw. A. bidest. oder Normalmedium (Kontrolle) behandelt. Lyse und Messung der RLU erfolgten mit dem „Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer“. Die RLU-Werte wurden auf Gesamtprotein normiert. Angegeben sind die Mittelwerte aus n unabhängigen Versuchen ± SEM (falls n > 2) bzw. ± Abweichung vom Mittelwert (falls n = 2). Als Bezug diente jeweils der Mittelwert der analog transfizierten, mit A. bidest./Normalmedium (Kontrolle) behandelten Zellen. *: signifikant (p < 0,05) gegenüber der Kontrolle.

B: Dieselbe Versuchsreihe, bezogen auf Beta-Galaktosidase.

Die Aktivierung von *DYRK1A*-Promotor B durch den Transkriptionsfaktor E2F1 wurde auch in anderen Zellsystemen nachgewiesen. So aktivierte überexprimiertes E2F1 (0,5 µg pCMV•SPORT6-E2F1) in transient transfizierten HeLa-Zellen die Aktivität des

Promotors B ca. 1,8-fach, wohingegen es die Aktivität des Leervektors pGL3-Basic drastisch senkte (Daten nicht gezeigt). Vor diesem Hintergrund war die Aktivierung des Promotors B bedeutsam und in ihrem Ausmaß wohl aufgrund der starken Hemmung der Aktivität des Leervektors durch derart überexprimiertes E2F1 noch unterschätzt. Ähnliches könnte auch für PC-3-Zellen gelten, in denen überexprimiertes E2F1 (0,25 µg pCMV•SPORT6-E2F1) weder *DYRK1A*-Promotor A noch B aktivierte (drei unabhängige Versuche; Daten nicht gezeigt). In PC-3-Zellen wurde der Effekt von überexprimiertem E2F1 auf den Leervektor nicht untersucht.

3.6.2 Kein Anstieg der DYRK1A-Proteinmenge durch exogenes E2F1

Da DYRK1A in SAOS-2-Zellen für einen Nachweis im *Western blot* zu schwach exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt), wurde der Effekt von E2F1 auf die Translation der *DYRK1A*-mRNA in PhoenixTM-Zellen untersucht. Die in PhoenixTM-Zellen beobachtete Hochregulation der *DYRK1A*-mRNA durch überexprimiertes E2F1 (Abb. 3.24 B) wirkte sich nicht auf den DYRK1A-Proteingehalt der Zellen aus (Abb. 3.28). Auffällig war die Verringerung der Zellzahl unter dem Einfluss von überexprimiertem E2F1 (1,0 µg pCMV•SPORT6-E2F1), was auf eine Schädigung der Zellen hindeutete.

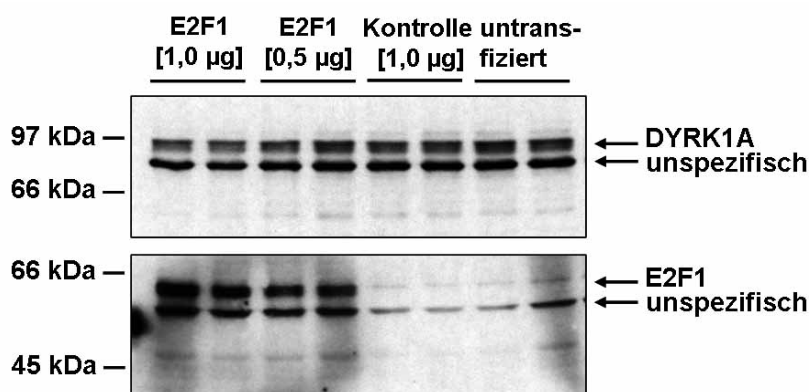


Abb. 3.28: Kein Anstieg der DYRK1A-Proteinmenge durch überexprimiertes E2F1 in PhoenixTM-Zellen

PhoenixTM-Zellen (80.000/6-Well) wurden am Tag nach der Aussaat mit 1,0 µg pCMV•SPORT6-E2F1 (RZPD, Berlin; GenBank®-Nr. BC050369), 0,5 µg pCMV•SPORT6-E2F1 + 0,5 µg pCMV•SPORT6 (Kontrolle) bzw. 1,0 µg pCMV•SPORT6 (Kontrolle) in je 2 Wells transient transfiziert oder nicht transfiziert. Zwei Tage später erfolgte eine denaturierende Lyse der Zellen. Nach 8%-SDS-PAGE wurden die endogene DYRK1A und überexprimiertes E2F1 im *Western blot* nachgewiesen.

3.7 *DYRK1A* – ein mögliches *Target*-Gen des Transkriptionsfaktors CREB

Im Rahmen einer SACO (*Serial Analysis of Chromatin Occupancy*; Kombination aus Chromatinimmunopräzipitation und modifizierter SAGE)- und Affymetrix-Analyse cAMP-regulierter Gene in PC-12-Zellen (Phäochromozytom-Zelllinie der Ratte) wurde *DYRK1A* als *Target*-Gen des Transkriptionsfaktors CREB (*cyclic AMP Response Element Binding Protein*) identifiziert. CREB, das u. a. eine wichtige Rolle bei neuro-naler Differenzierung und synaptischer Plastizität spielt, bindet *downstream* von der *DYRK1A*-3'-UTR und reguliert nach Forskolin-induzierter Aktivierung der Adenylatcyclase die *DYRK1A*-Genexpression hoch (Impey *et al.*, 2004).

Da der *DYRK1A*-Promotor A ein CRE (*cyclic AMP Response Element*)-Motiv aufweist (5'-**GGACGTCA**-3' statt 5'-**TGACGTCA**-3') (Abb. 3.1), wurde zunächst im DNA-Retardierungs-Assay (EMSA) überprüft, ob CREB an den *DYRK1A*-Promotor A bindet. Forskolin bewirkt als Aktivator der Adenylatcyclase einen cAMP-Anstieg, eine Aktivierung der Proteinkinase A und demzufolge eine Phosphorylierung von CREB, welches wiederum erst als Phospho-CREB die Expression seiner *Target*-Gene hochreguliert. Im unphosphorylierten Zustand kann CREB an DNA binden, aber keine Transkription stimulieren.

In 24 h lang serumfrei (vgl. 12 bis 16 h bei Impey und Kollegen, 2004) oder unter Normalbedingungen gewachsenen PC-12-Zellen führte eine ca. 30-minütige Behandlung mit Forskolin [10 µM] zu einer deutlichen Phosphorylierung von CREB (Abb. 3.29), die für den *Supershift* (s. S. 99 und 100) erforderlich war.

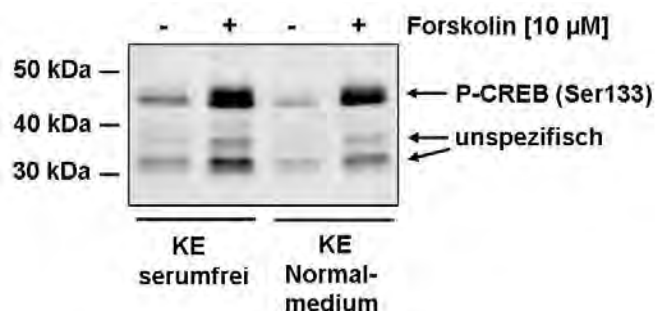


Abb. 3.29: cAMP-induzierte Phosphorylierung von CREB in PC-12-Zellen

In den Kernextrakten (KE) von PC-12-Zellen, die vor ihrer ca. 30-minütigen Forskolin [10 µM]- bzw. DMSO (Kontrolle)-Behandlung 24 h lang ohne Serum bzw. in Normalmedium gewachsen waren (s. Abb. 3.30, Abb. 3.31), wurde an Serin 133 phosphoryliertes CREB (P-CREB, Ser133) nach 10%-SDS-PAGE im *Western blot* nachgewiesen.

In EMSAs (*Electrophoretic Mobility Shift Assays*) wurde eine schwache Bindung von P-CREB¹⁷ an den *DYRK1A*-Promotor A nachgewiesen (Abb. 3.30, Abb. 3.31). Die Spezifität der Bindung von P-CREB an das doppelsträngige CRE-Oligonukleotid wurde an zwei unterschiedlich großen (P-)CREB¹⁸/CRE-Komplexen deutlich, aus denen (P-)CREB durch 100-fach molaren Überschuss unmarkierten, konkurrierenden CRE-Oligonukleotides (5'-...TG**AC**GTCA...-3') verdrängt wurde, nicht jedoch durch 100-fach molaren Überschuss unmarkierten, mutierten CRE-Oligonukleotides (5'-...TG**TG**GTCA...-3'; Tab. 2.7, Abb. 3.30). Der 100-fach molare Überschuss an unmarkiertem CRE-Motiv-Oligonukleotid des *DYRK1A*-Promotors A führte zu einer partiellen Verdrängung von (P-)CREB aus seiner Bindung an das radioaktiv markierte CRE-Oligonukleotid. Dies bedeutet, dass (P-)CREB zwar schlechter an den *DYRK1A*-Promotor als an CRE bindet, aber auch, dass es besser an den *DYRK1A*-Promotor als an mutiertes CRE bindet. Auch der *Supershift* in Form eines Komplexes aus P-CREB (Ser133) I/II, CRE-Oligonukleotid und P-CREB-Antikörper bewies die Existenz zweier unterschiedlich großer (P-)CREB/CRE-Komplexe, deren Banden im Gel nach Bindung an den P-CREB (Ser133)-spezifischen Antikörper verschwanden und in Form einer retardierten Einzelbande erschienen. Der Phospho-CREB-Antikörper *shiftete* auch den Komplex aus P-CREB (Ser133) I/II und *DYRK1A*-Promotor A-Oligonukleotid, der schwächer erschien als der P-CREB (Ser133) I/II/CRE-Komplex und aus dem sich ebenfalls das *DYRK1A*-Promotor A-Oligonukleotid durch konkurrierendes unmarkiertes CRE-Oligonukleotid im 100-fach molaren Überschuss, nicht jedoch durch mutiertes unmarkiertes CRE-Oligonukleotid im 100-fach molaren Überschuss verdrängen ließ (Abb. 3.30).

¹⁷ Phospho-CREB

¹⁸ phosphoryliertes bzw. unphosphoryliertes CREB

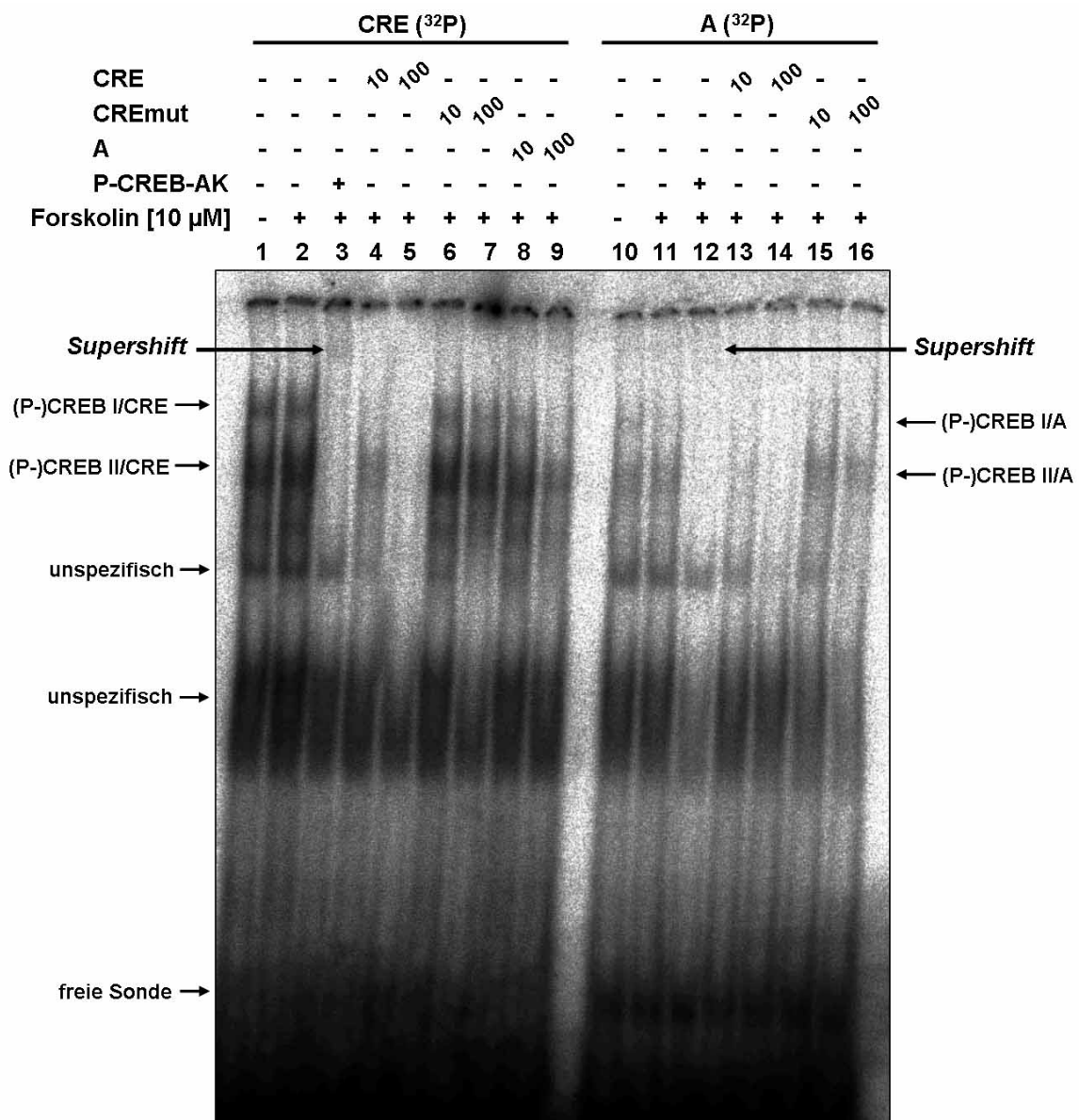


Abb. 3.30: (P-)CREB/*DYRK1A*-Promotor A-Bindung in PC-12-Zellen (Normalmedium)

PC-12-Zellen (1.000.000/10 cm-Platte) waren nach dreitägigem Wachstum in Normalmedium subkonfluent. Nach ca. 30-minütiger Behandlung mit Forskolin [10 µM] bzw. DMSO (Kontrolle) wurden die Zellkerne extrahiert (*Pool* aus je drei identisch behandelten Platten) und im EMSA analysiert. A: Oligonukleotidsequenz aus *DYRK1A*-Promotor A; AK: Antikörper (2 µl, 5 h, 4°C); 10 bzw. 100: unmarkiertes („kaltes“) Oligonukleotid im 10-fach bzw. 100-fach molaren Überschuss im Vergleich zum ³²P-markierten („heißen“) Oligonukleotid. Freie Sonde: ungebundenes markiertes Oligonukleotid.

Die starke Bindung von (P-)CREB an das CRE-Oligonukleotid und die schwache Bindung von (P-)CREB an das Oligonukleotid mit dem CRE-Motiv des *DYRK1A*-Promotors A wurde auch in Kernextrakten von PC-12-Zellen nachgewiesen, die 24 h vor der Forskolin-Behandlung ohne Serum gewachsen waren (Abb. 3.31). Während der

Phospho-CREB-spezifische Antikörper die (P-)-CREB/DNA-Komplexe retardierte, ging der E2F1-spezifische Antikörper keine Bindung mit den P-CREB/DNA-Komplexen ein und führte nicht zu *Supershifts*. Das Promotor A-Oligonukleotid ließ sich durch unmarkiertes CRE, nicht jedoch durch mutiertes CRE (jeweils im 100-fach molaren Überschuss) aus der (P-)CREB-Bindung verdrängen (Abb. 3.31).

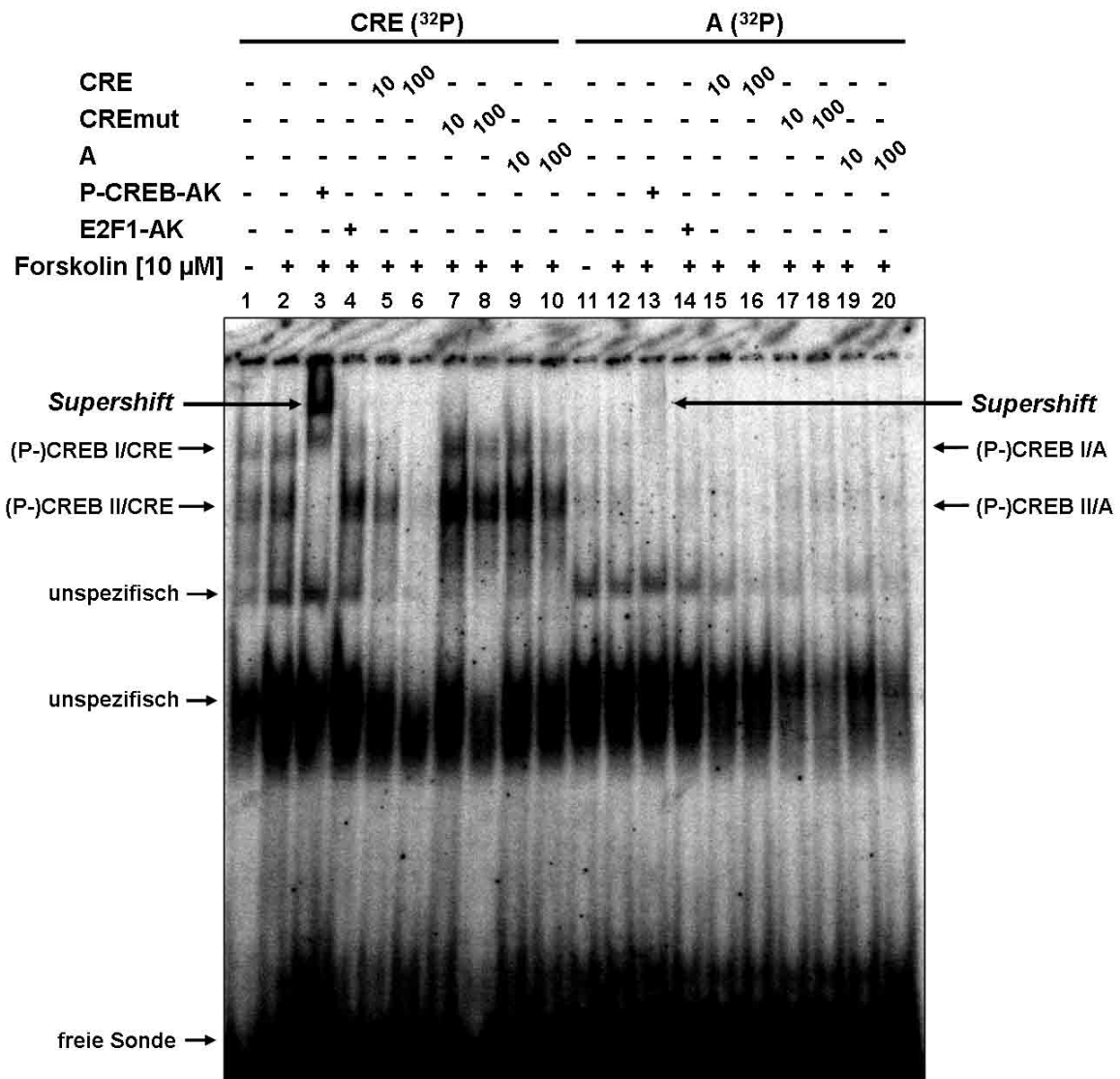


Abb. 3.31: (P-)CREB/DYRK1A-Promotor A-Bindung in PC-12-Zellen (Serumentzug)

PC-12-Zellen (1.000.000/10 cm-Platte) waren nach zweitägigem Wachstum in Normalmedium subkonfluent. Nach 24 h Serumentzug und darauffolgender ca. 30-minütiger Behandlung mit Forskolin [10 µM] bzw. DMSO (Kontrolle) wurden die Zellkerne extrahiert (*Pool* aus je drei identisch behandelten Platten) und im EMSA analysiert. A: Oligonukleotidsequenz aus *DYRK1A*-Promotor A; AK: Antikörper; P-CREB-AK: 2 µl, 5 h, 4°C; E2F1-AK: 3 µl, 5 h, 4°C; 10 bzw. 100: unmarkiertes („kaltes“) Oligonukleotid im 10-fach bzw. 100-fach molaren Überschuss im Vergleich zum ³²P-markierten („heißen“) Oligonukleotid. Sonde: ungebundenes markiertes Oligonukleotid.

Da das CRE-Oligonukleotid nicht vollständig durch einen 100-fach molaren Überschuss an unmarkiertem *DYRK1A*-Promotor A-Oligonukleotid aus seiner Bindung mit (P-)CREB verdrängt werden konnte, wird auch bei Serumentzug von einer schwachen Bindung von (P-)CREB an den *DYRK1A*-Promotor A ausgegangen (Abb. 3.31).

Nun wurde in Reporter-Gen-Assays untersucht, ob *DYRK1A* cAMP-responsiv ist. Die Effektivität des Forskolins (die cAMP-vermittelte Phosphorylierung von CREB) wurde anhand der Stimulation der CRE-gesteuerten Luciferaseaktivität in Reporter-Gen-Assays nachgewiesen: das CRE-Luc-Plasmid (Stratagene[®], La Jolla, USA) diente als Positivkontrolle und enthält das CRE in vierfacher Kopienzahl. In PC-12-Zellen (Abb. 3.32) und PC-3-Zellen (Abb. 3.33) stimulierte Forskolin [10 µM] die CRE-kontrollierte Luciferaseaktivität ca. 3-fach, in SAOS-2-Zellen sogar ca. 10-fach (Daten nicht gezeigt).

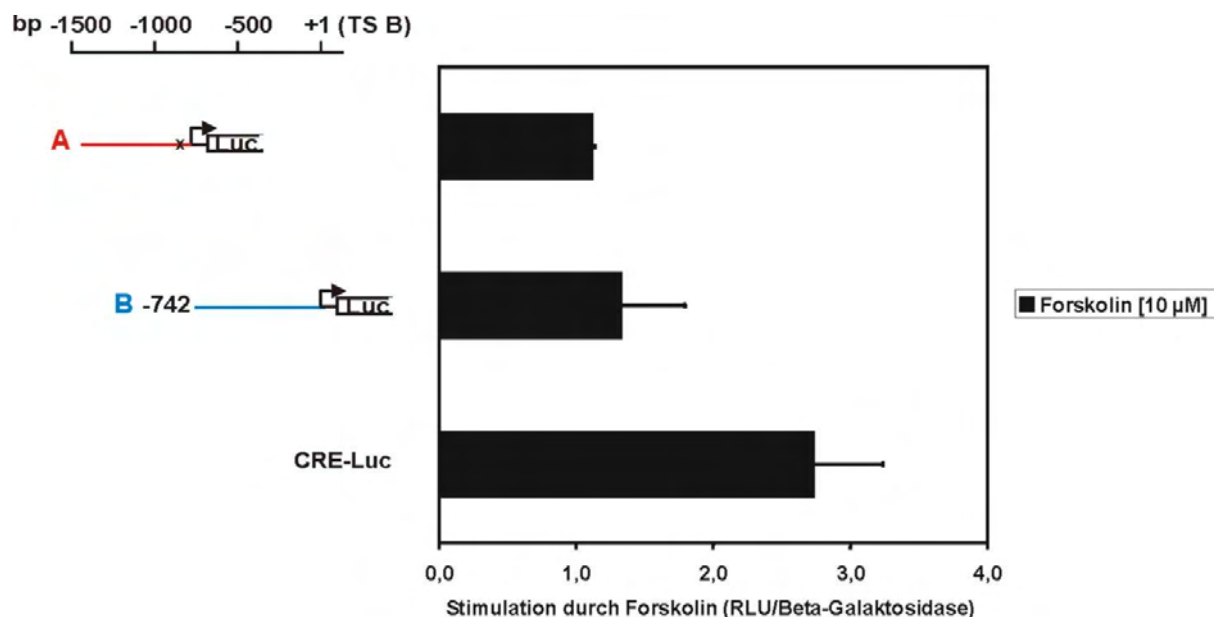


Abb. 3.32: Kein Effekt von P-CREB auf die Aktivitäten der Promotoren A und B in PC-12-Zellen

PC-12-Zellen (600.000/6-Well) wurden am Tag nach der Aussaat mit 0,1 µg des *DYRK1A*-Promotor A- bzw. *DYRK1A*-Promotor B-Konstruktes bzw. 0,1 µg pCRE-Luc (Positivkontrolle) und 0,25 µg pSV-β-Galactosidase in je 4 Wells transient transfiziert. Einen Tag später (ca. 90% Konfluenz) wurden die Zellen mit Forskolin [10 µM] bzw. DMSO (Kontrolle) behandelt. Am Tag danach erfolgten Lyse und Messung der RLU mit dem „Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer“. Die RLU-Werte wurden auf Beta-Galaktosidase normiert. Angegeben sind die Mittelwerte eines Versuchs ± Abweichung der beiden Messwerte vom Mittelwert. Als Bezug diente jeweils der Mittelwert der analog transfizierten, mit DMSO (Kontrolle) behandelten Zellen. Das CRE-Motiv ist als schwarzes Kreuz dargestellt.

Nach Forskolin-induzierter Aktivierung der Adenylatcyclase aktivierte CREB Promotor A jedoch weder in PC-12-Zellen noch in PC-3- bzw. SAOS-2-Zellen (Abb. 3.32, Abb. 3.33; Daten in SAOS-2-Zellen nicht gezeigt).

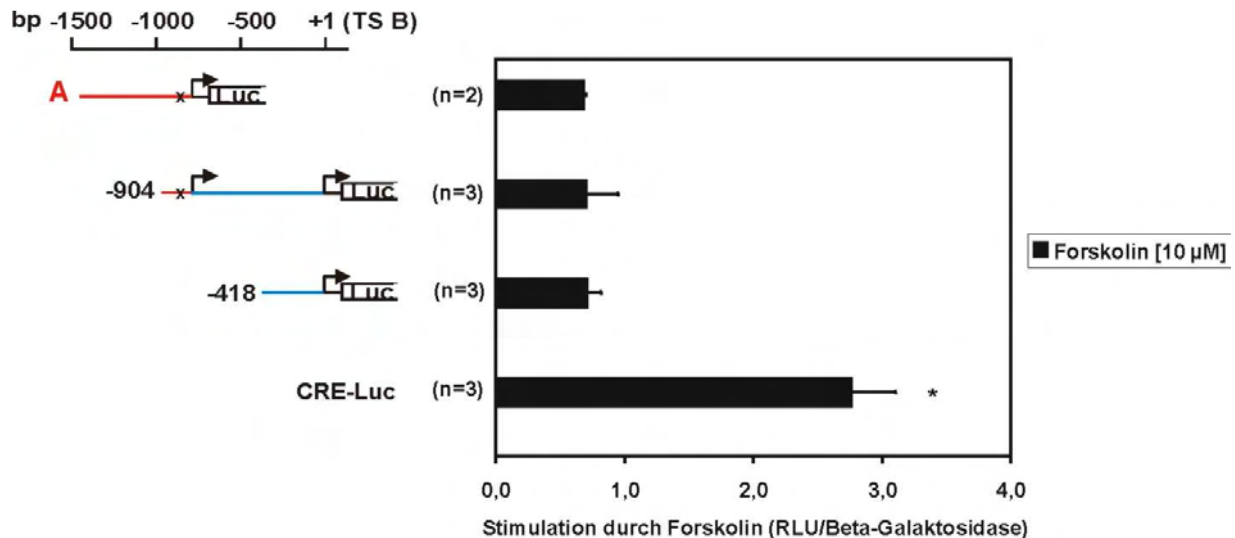


Abb. 3.33: Kein Effekt von P-CREB auf die Aktivitäten der Promotoren A und B in PC-3-Zellen

PC-3-Zellen (200.000/6-Well) wurden am Tag nach der Aussaat mit 0,1 µg des angegebenen Promotorkonstruktes bzw. 0,5 µg pCRE-Luc (Kontrolle) und 0,25 µg pSV-β-Galactosidase in je 4 Wells transient transfiziert. Einen Tag später wurden die Zellen mit Forskolin [10 µM] bzw. DMSO (Kontrolle) behandelt. Am Tag danach erfolgten Lyse und Messung der RLU mit dem „Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer“. Die RLU-Werte wurden auf Beta-Galaktosidase normiert. Angegeben sind die Mittelwerte aus n unabhängigen Versuchen ± SEM (falls n > 2) bzw. ± Abweichung der beiden Messwerte vom Mittelwert (falls n = 2). Als Bezug diente jeweils der Mittelwert der analog transfizierten, mit DMSO (Kontrolle) behandelten Zellen. Das CRE-Motiv ist als schwarzes Kreuz dargestellt. *: signifikant (p < 0,05) gegenüber der Kontrolle.

3.8 Stabilität der *DYRK1A*-mRNA

Die untranslatierte Region am 3'-Ende der *DYRK1A*-mRNA (3'-UTR) beinhaltet sieben AU-reiche Elemente (AREs, *A/U-Rich Elements*) mit der Sequenz 5'-**AUUUA**-3', die einen schnellen Abbau der *DYRK1A*-mRNA nahe legen (Wilson & Treisman, 1988; Caballero *et al.*, 2004) (Abb. 3.34). Ein Vergleich der murinen und der humanen 3'-UTR-Sequenz des *DYRK1A*-Gens ergab eine Konservierung von vier AU-reichen Sequenzen, sodass in beiden Spezies eine relativ kurze Halbwertszeit der *DYRK1A*-mRNA vermutet wurde.

Zur Untersuchung der Stabilität der endogenen *DYRK1A*-mRNA wurden die humane Prostataadenokarzinom-Zelllinie PC-3 und die murine Fibroblasten-Zelllinie NIH-3T3 mit dem Transkriptioninhibitor Aktinomycin D [5 µg/ml] bzw. DMSO (Kontrolle) behandelt. Vor der Behandlung bzw. nach 30, 60, 120 bzw. 240 min wurde die Gesamt-RNA isoliert. Der Verlauf des Abbaus der *DYRK1A*-mRNA und der *GAPDH*-mRNA (Ladungskontrolle) wurde in *Northern blots* analysiert. Die Halbwertszeit endogener *DYRK1A*-mRNA betrug in PC-3-Zellen ca. 120 min, in NIH-3T3-Zellen ca. 240 min (Abb. 3.34 bis Abb. 3.36). Dies bedeutet, dass sowohl die humane als auch die murine *DYRK1A*-mRNA – möglicherweise aufgrund mehrerer AU-reicher Sequenzelemente in der 3'-UTR – im Vergleich zur *GAPDH*-mRNA relativ instabil ist. Die kürzere Polyadenylierungsvariante ohne die AU-reichen Elemente, die für die Maus typisch ist, aber im humanen Organismus nicht gebildet wird, war stabiler als die murine *DYRK1A*-mRNA normaler Länge, lag aber in der Bandenintensität nahe am Hintergrund, sodass keine Quantifizierung möglich war (Abb. 3.36).

In PC-3-Zellen wurde die *GFP-DYRK1A*-mRNA (Labor-interne Bezeichnung für die *EGFP-DYRK1A*-mRNA), der die 2,3 kb umfassende Teilsequenz der 3'-UTR mit den sieben AU-reichen Sequenzelementen fehlen, deutlich langsamer abgebaut als das endogene *DYRK1A*-Transkript. Sie war länger als vier Stunden stabil, d. h. ähnlich stabil wie die *GAPDH*-mRNA (Abb. 3.35).

Dies deutet darauf hin, dass die 3'-UTR der *DYRK1A*-mRNA für deren schnellen Abbau von Bedeutung ist.

	Q	Q	S	P	V	A	S	S	*										
2.646	CAACAGAGTC	CTGTAGCTAG	CTCGTGACTA	CATTGAAACT	TGAGTTTGT	TCTTGTGTGT													
2.706	TTTTATAGAA	GTGGTGTTTT	TTTTCCAAAA	ACAAAGTGCA	AAGCTGCTTG	AATCAGGAGG													
2.766	AGATTAAACAC	ACTGAACCGC	TACAAGAGGG	CAAAGCTGAT	TTTTTTTTTTA	ACTTGAAAAG													
2.826	ATTGCAAAGG	GACATTGAAG	TGTTTAAAAG	AGCCATGTCC	AAACCCATCT	TCATGGATAG													
2.886	CTCAGAGGTA	TCCTCTTTTT	GCTCCCCCAT	TTTAACTTGC	CACATCCCAG	TCACAGTGGG													
2.946	GTTTTTTTGT	CTTCTATTTC	AGCAAAAAGT	AATATTCAGA	TGTTGGTCTT	GGTCATTTCG													
3.006	CAACTAATTT	TAAAGTAAAA	GGCACTGCAC	ATAATTTGCA	TAAAGGGCCC	CATGAGGGTG													
		3'-Ende der GFP-DYRK1A-mRNA			3'-Ende der DYRK1A-mRNA-Polyadenylierungsvariante in Maus und Ratte														
3.066	TTTTTTTTTTT	TTCTTTTTGT	CCCCCCCCATC	CCCCTTTTTT	TTTGTTTTGT	TCTGTTTTGT													
3.126	TTTGGGTGGG	AGGGTGGGAA	ATTTGGGTTT	TTAAGTCCTC	TAAACACACT	TGGGCACGGA													
3.186	AATGCAGTAC	TGTAAGGAAG	AGGGACCTCC	AGCTTCCACA	AACACCATCT	TCAGCTGTAT													
3.246	GAAAGGGACG	GTTGTGGTGA	AGTTTGTCTG	GCACAGTAAG	CATGCTGAGT	GGCGGGGATC													
3.306	AGAACTCTCC	TATCTGAACC	TACTGAGGAG	CAAAGCAGCA	ATTACATGGG	ATCCTGTGGC													
3.366	TCTCCCGTTG	CAGAGGCCAC	AGGAAGATAG	GATGGAACGT	GACTGGTCTC	CTAACCAAGG													
3.426	TGCACTGAGA	AGCAATCAAC	GGGTCGGTCG	TGGCCAGTCC	TGGGGAGGTC	TGAGTGGTGG													
3.486	TCTTTGGGAT	AACCTTTGGC	CTTATGGATT	TGGACTCGAA	ATTAGAAGAG	CCTACCATT													
3.546	CAGATGCAAT	CACTTTTGGA	CATGCTTTTG	CAGACAGTCC	TAAATGCTGA	AAACACAGAG													
3.606	AATGGGTAAAT	TCAAGAGGCC	TTTCTTTTAA	AATAGACTTT	TGTGACCCAC	TAATTGTAAG													
3.666	GTATTGCAAG	GTCACTTTGC	GTGTGTCATA	AAGTTGACTT	CCTTATTGGT	TGAAGGTCAC													
3.726	AGAAGTAGTG	GTTTGCTTTG	ATGGAAATAG	CTACAGCTGT	GTCCCTTCCT	GCTTTTTACT													
3.786	TTTTCTTTTG	CTTTTCTCTG	GCACGTGGTA	TCTCCACCAT	TTCTTCTGCA	CAAAGATGTC													
3.846	TTCTGTTTAT	CCTGAACATT	TTTAAAAAAT	GCAGAATTTT	ATGTGACTGC	TTTTTGCCT													
3.906	CACAATTATG	CTGTGAATTT	TACAAAATT	ATT TA	TTTTTCTTT	TTTGATA	ATT TA												
3.966	AAGCTGTTTT	TATAGCACAT	AGATGTCTGT	AACCAATAAT	GTAGCAGTTC	TGCACTTTGA													
4.026	CACAAGGTGT	AACTAGACCA	TTTTTAAATG	TCAGTTGAAA	ATTATGGCTG	TACTATTGCT													
4.086	TAAACAAAAC	TGGAAGTGT	GTTGAATCCA	TAGCCAATAC	ATTTA	CAGCA	ATCTGTGTAC												
4.146	TGAACATAGT	AGATTGACAT	CTAATTCAAG	ATTACAACAT	CTGTTACATT	CTAAGTGTGT													
4.206	TCAGGCTTCT	GAAGGTAAAG	GGACACTGGA	TCCAGAAGCT	ATGGAACAG	CAGTTGATTC													
4.266	TTGTATTTCCT	GATTAACCTA	CTTGTAAGT	TGAAAGCAAG	ACCTTGATTG	CACCAACAGG													
4.326	TCCAGAGTAT	GAGTGCAAGC	AAAGCAGAAC	TCTCATGCGT	GACCTGAGCA	GACAGGCTGG													
4.386	ATTTA	ACAG	GTGCCTCGTG	TTGAGATTAC	GCTGCCTTAA	TGTAACACAG	TCTGGCAGTT												
4.446	GCTAAATTTG	TGTTCCCAT	TTAAATTGAC	CAATTTTGGG	GTGTGACACT	TTTGAGCGGT													
4.506	TGAATTGGGA	GAATGAAGAT	AAGTA	ATTTA	CCTGTCCAGG	ATCAAAAGAA	GCCTAGAAAA												
4.566	GAAGCAGTAA	TCTACCTCTG	CCGATAACCT	GTTTAAGATG	ACTCAGCAGA	ACACCGCGTT													
4.626	TCATTCTATT	GGTCAATTCC	ATGTGGCTGA	CTAGGTCAAT	TTTTTTTCTG	AACAAAAGCA													
4.686	GGTTTTTATA	TGTAAACAGT	GAGAAAAGAA	AGGCTAAACA	CTATGTAAAT	GTGAATGGAA													
4.746	ACTTGGAAT	ACTCGTTTTT	ATAAACTACA	AAAACTTTTT	GTGTTTATC	AGGAAATCCA													
4.806	ATTTA	TTTT	GTAATTAAC	GTCAAGCCTG	TGGATGATT	TTTTGAAC	GGTATTCAT												
4.866	AAAGGTTTAC	AGTGAATAAA	AGGATATCAT	CTTGAGTATA	GCAATATCAA	AAGGAATCCA													
4.926	TGATTACTAG	CTGTTTAGGA	ATATAAGGTT	AAGATATCAT	ATGGGTCAGG	TCATTTTTTT													
4.986	TTTCTGTGCT	GGTTGCCACA	TCTTAGCAAG	CACCAAAAAA	CTAAAGCAGT	TTTTAAACCG													
5.046	AT	ATTTA	CGT	AAAGAAAATC	ATAAAATCCA	ATGCTTCTGC	ATACTGTGTT	ATGTTACAGT											
5.106	CCAGTTTTTGT	GTGCTTTACT	ACACAGTTTG	GTTACAGGAC	TTCTGTGCAT	TGTAACATA													
5.166	AACAGCATGG	AAAAGGTTAA	ATACCTGTGT	TCAGATTGTA	AGATCTAGTC	CGGACTTGCT													
5.226	GTGTATATTG	TAACGTTAAA	TGAAAAAAGA	ACCCCCCTTT	GTATTATAGT	CATGCGGTCT													
5.286	TATGTATGAT	AAACAGTTGA	ATAATTTGTC	(AAAAA)															

Abb. 3.34: 3'-Nukleotidsequenz der humanen *DYRK1A*-cDNA mit der GenBank®-Nr. NM_101395

Das Stoppcodon (*) trennt die kodierende Nukleotidsequenz (Aminosäuresequenz darüber angegeben) der *DYRK1A*-cDNA mit der GenBank®-Nr. NM_101395 von ihrer 3'-UTR, die mit einem Poly-A-Schwanz endet (n: unbestimmte Adenin-Anzahl). Die 3'-Enden der *GFP-DYRK1A*-mRNA und der Polyadenylierungsvariante in Maus und Ratte sind grün bzw. blau gekennzeichnet. Die ARES sind in roter, fetter Schrift und gelb unterlegt dargestellt. Die in Mensch und Maus konservierten ARES sind von einem Kasten umgeben.

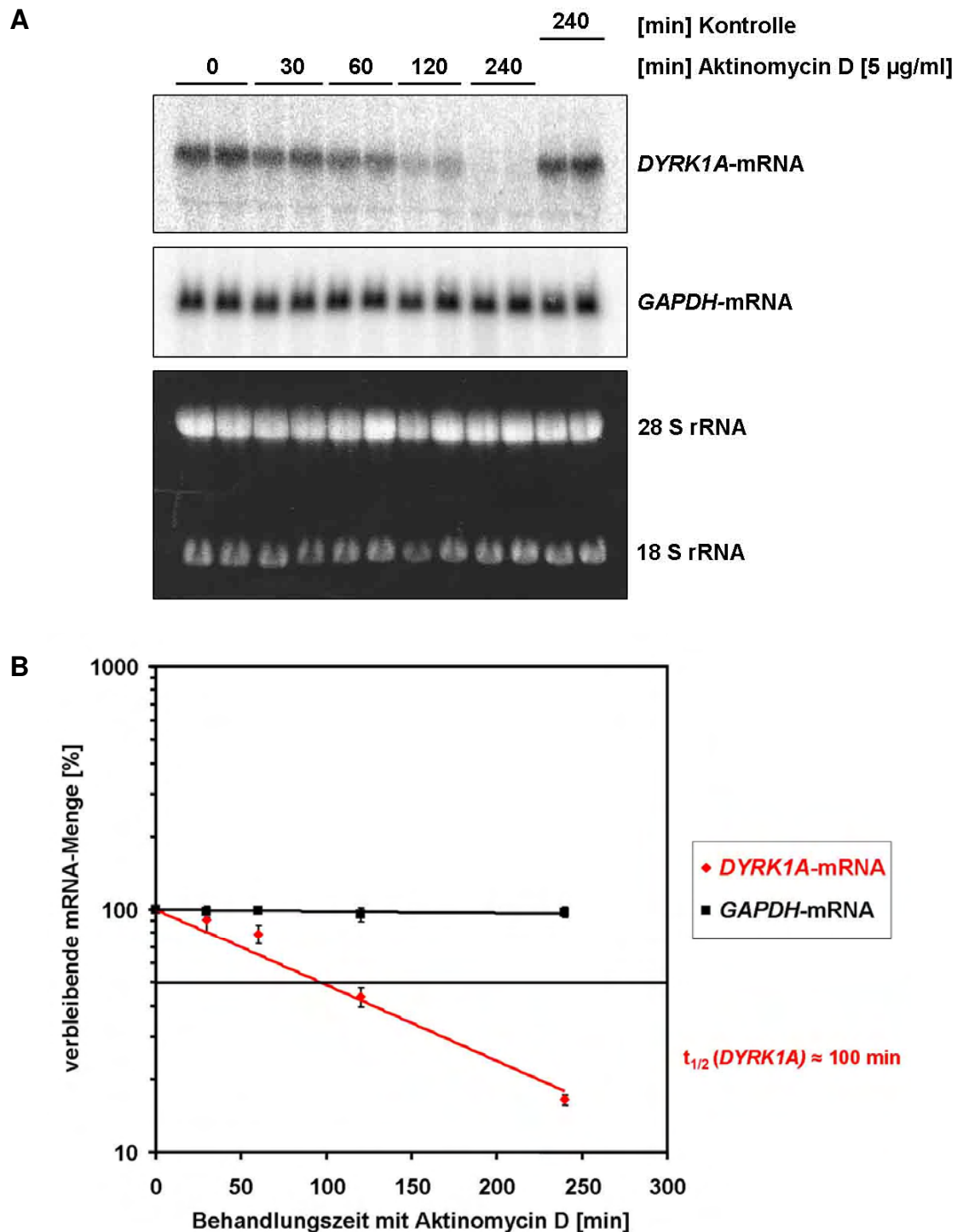


Abb. 3.35: Stabilität der *DYRK1A*-mRNA in PC-3-Zellen

A: PC-3-Zellen (350.000/10 cm-Platte) erreichten nach 4 Tagen ca. 70% Konfluenz. Die Zellen auf je zwei Platten wurden mit Aktinomycin D [5 µg/ml] bzw. DMSO (Kontrolle) behandelt. Die RNA-Isolation erfolgte nach 0 min (unbehandelt), 30, 60, 120 bzw. 240 min. Gezeigt sind die Hybridisierungen eines Northern blots mit *DYRK1A*- bzw. *GAPDH*-cDNA sowie die Ethidiumbromidfärbung (unten), die – wie die *GAPDH*-mRNA – als Ladungskontrolle diente.

B: *DYRK1A*- bzw. *GAPDH*-mRNA-Mengen unter Aktinomycin D-Behandlung („AIDA“-Software). Angegeben ist jeweils der Mittelwert ± Abweichung vom Mittelwert. $t_{1/2}$: mRNA-Halbwertszeit.

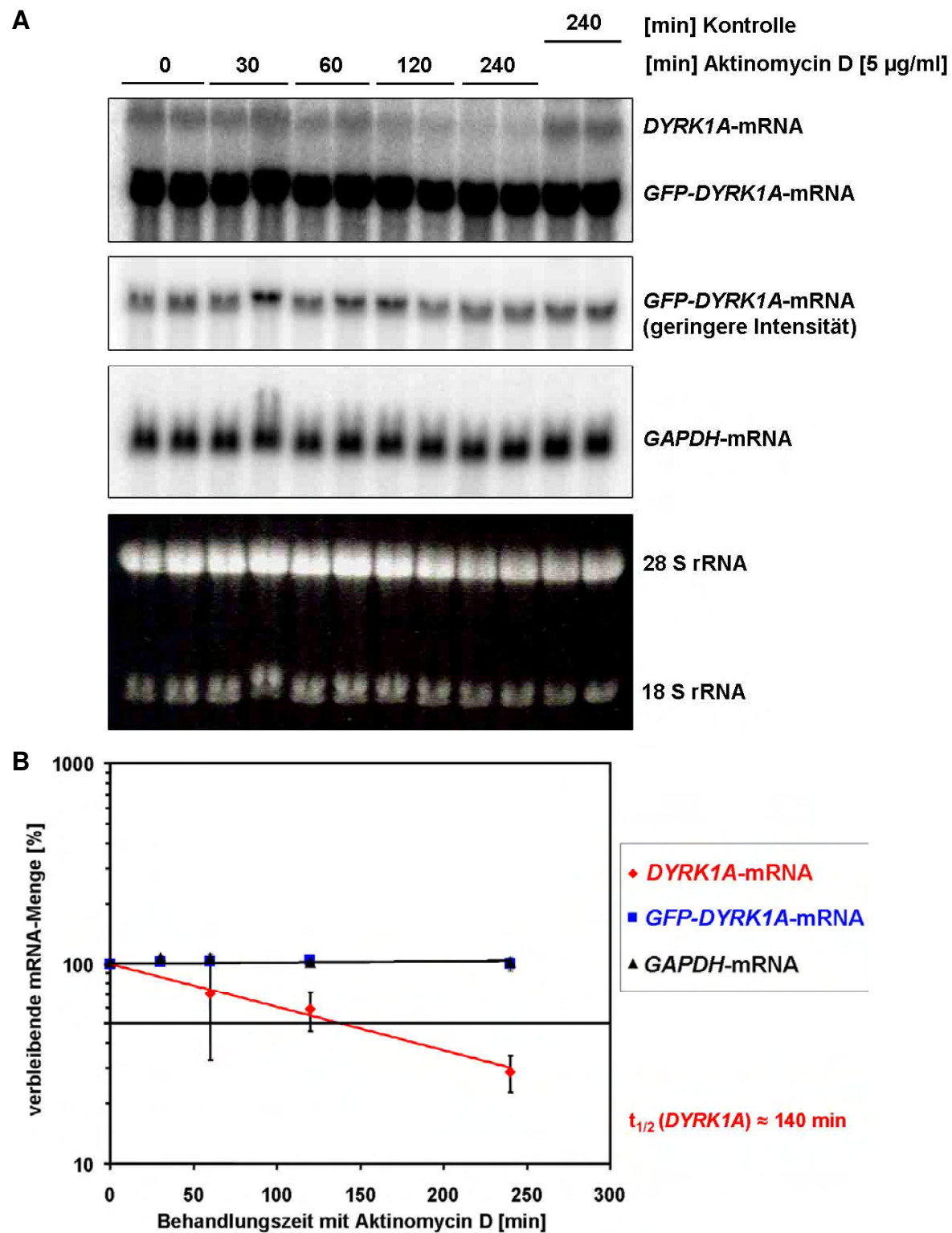


Abb. 3.36: Stabilität der *GFP-DYRK1A*-mRNA ohne AU-reiche Elemente in PC-3-Zellen

A: PC-3-Zellen (350.000/10 cm-Platte) wurden nach 3 Tagen mit 2 µg pEGFP-C1-DYRK1A (unsere Arbeitsgruppe) transient transfiziert und waren einen Tag später fast konfluent. Die Zellen auf je 2 Platten wurden mit Aktinomycin D [5 µg/ml] bzw. DMSO (Kontrolle) behandelt. Die RNA-Isolation erfolgte nach 0 min (unbehandelt), 30, 60, 120 bzw. 240 min. Gezeigt sind Hybridisierungen (vgl. Abb. 3.35) eines *Northern blots* sowie die Ethidiumbromidfärbung (unten) als weitere Ladungskontrolle.

B: Quantifizierungen analog zu Abb. 3.35; zusätzlich *GFP-DYRK1A*-mRNA. $t_{1/2}$: mRNA-Halbwertszeit.

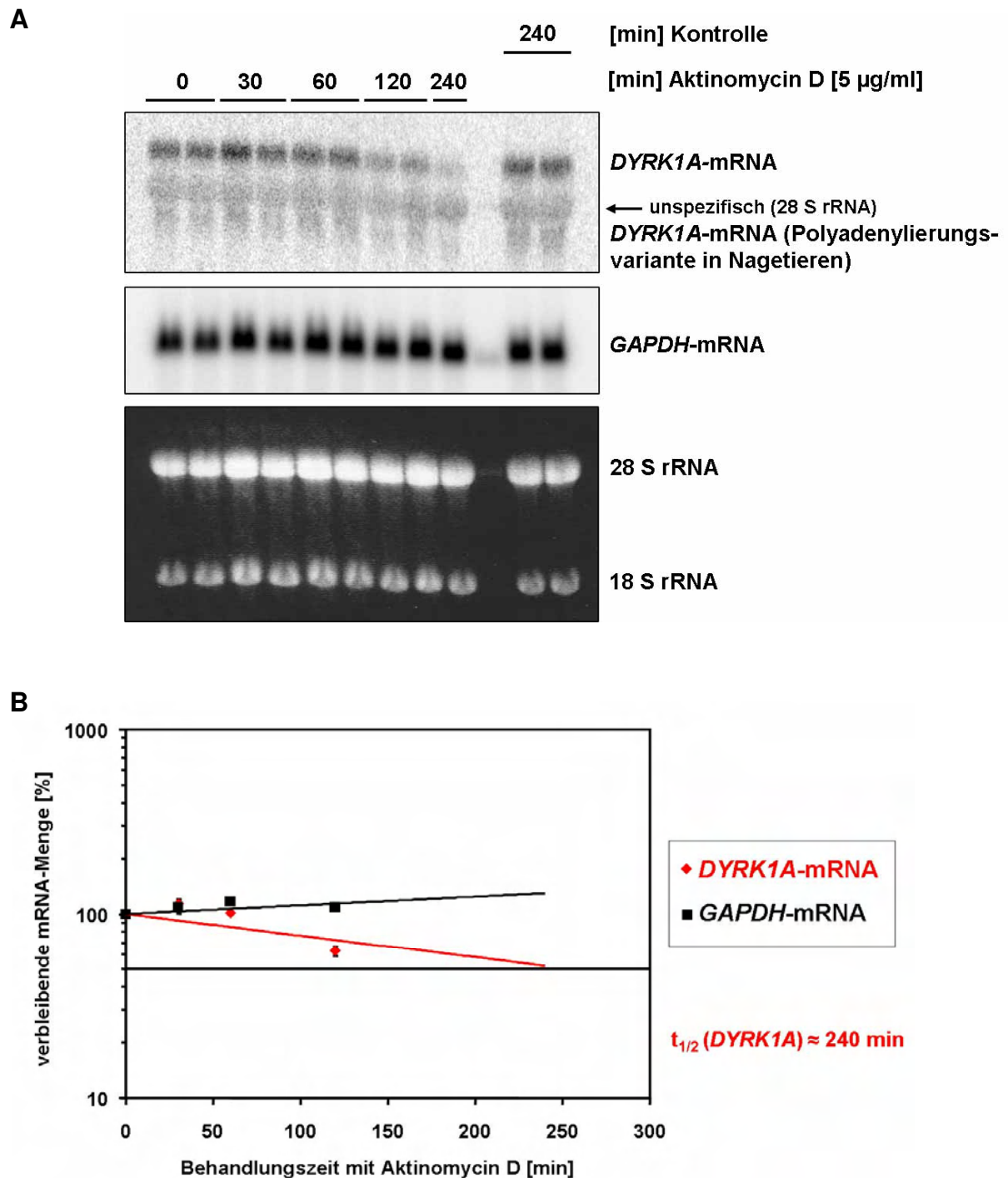


Abb. 3.37: Stabilität der *DYRK1A*-mRNAs in NIH-3T3-Zellen

A: NIH-3T3-Zellen (400.000/10 cm-Platte) wurden nach 5 Tagen auf je zwei Platten mit Aktinomycin D [5 µg/ml] bzw. DMSO (Kontrolle) behandelt. Die RNA-Isolation erfolgte nach 0 min (unbehandelt), 30, 60, 120 bzw. 240 min. Gezeigt sind die Hybridisierungen eines *Northern blots* mit *DYRK1A*- und *GAPDH*-cDNA sowie die Ethidiumbromidfärbung (unten), die – wie die *GAPDH*-mRNA – als Ladungskontrolle diente.

B: *DYRK1A*- bzw. *GAPDH*-mRNA-Mengen unter Aktinomycin D-Behandlung („AIDA“-Software). Angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm Abweichung vom Mittelwert. Für „240 min Aktinomycin D“ wurde aufgrund nur einer auswertbaren Bande keine Quantifizierung durchgeführt. $t_{1/2}$: mRNA-Halbwertszeit.

3.9 Expression und Funktion von DYRK1B-Spleißvarianten

3.9.1 Spleißvarianten der Proteinkinase DYRK1B in adhärenenten Zelllinien

Die Proteinkinase DYRK1B tritt in mindestens drei Spleißvarianten unterschiedlicher Größe auf: DYRK1B-p65, -p69 und -p75, wobei „p“ für „Protein“ steht und die Zahl die jeweilige Proteinmasse in [kDa] repräsentiert. Die Kinase-inaktive Spleißvariante DYRK1B-p65 ist in der katalytischen Domäne um 40 Aminosäuren ärmer als die Kinase-aktive Spleißvariante DYRK1B-p69, da fast die erste Hälfte von Exon 9 herausgespleißt wird. Die katalytisch aktive Spleißvariante DYRK1B-p75 dagegen ist aufgrund eines alternativen Transkriptions- und Translationsstarts in Exon 1B 60 Aminosäuren länger als DYRK1B-p69, deren Transkription in Exon 1A bzw. Translation erst in Exon 2 beginnt (Leder *et al.*, 2003).

Alle drei Spleißvarianten ließen sich in den Nagetier-Insulinoma-Zelllinien RINm5F, HIT-T15 und INS-1 in *Western blots* nachweisen (Abb. 3.38 A). In der Maus-Fibroblasten-Zelllinie NIH-3T3 (Abb. 3.41 A, Abb. 3.42 B) und in der humanen Prostata-adenokarzinom-Zelllinie PC-3 (Abb. 3.38 B) wurden dagegen nur DYRK1B-p65 und DYRK1B-p69 identifiziert. Die Spleißvariante DYRK1B-p75 wurde auch bereits im Skelettmuskel der Maus, in der murinen Hypothalamus-Zelllinie GT1-7 (s. auch Abb. 3.38 B) sowie in differenzierten, Adipozyten-ähnlichen 3T3-L1-Zellen nachgewiesen (Leder *et al.*, 2003).

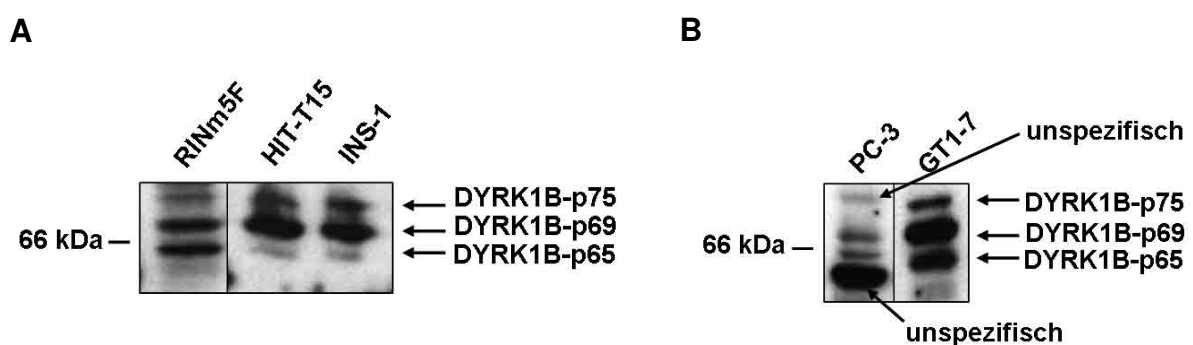


Abb. 3.38: DYRK1B-Spleißvarianten in adhärenenten Zelllinien

A: Die DYRK1B-Spleißvarianten p65, p69 und p75 in nativen Lysaten aus RINm5F-, HIT-T15- bzw. INS-1-Zellen wurden nach 8%-SDS-PAGE im *Western blot* mit DYRK1B-Antiserum nachgewiesen.

B: Die DYRK1B-Spleißvarianten p65 und p69 in denaturierten Lysaten aus PC-3- und GT1-7-Zellen wurden nach 8%-SDS-PAGE im *Western blot* mit DYRK1B-Antiserum nachgewiesen. DYRK1B-p75 dagegen wurde nur in GT1-7-Zellen nachgewiesen.

3.9.2 Funktionelle Charakterisierung von DYRK1B-Spleißvarianten

Die Proteinkinase DYRK1A interagiert mit dem Transkriptionsfaktor FKHR (*Forkhead in Rhabdomyosarcoma*) (Woods *et al.*, 2001b) und stimuliert, ebenso wie DYRK1B, die FKHR-abhängige Glukose-6-Phosphatase-Promotoraktivität (von Groote-Bidlingmaier *et al.*, 2003). Zur Untersuchung funktioneller, über die Kinaseaktivität hinausgehender Unterschiede zwischen den DYRK1B-Spleißvarianten, wurden in COS-7-Zellen die cDNAs von DYRK1B-p65, -p69 bzw. -p75, FKHR und des Glukose-6-Phosphatase-Promotors kotransfiziert. In Reporteragen-Assays aktivierten DYRK1B-p65, -p69 und -p75 den FKHR-abhängigen Glukose-6-Phosphatase-Promotor, DYRK1B-p65 allerdings recht schwach (Abb. 3.39) (Leder *et al.*, 2003).

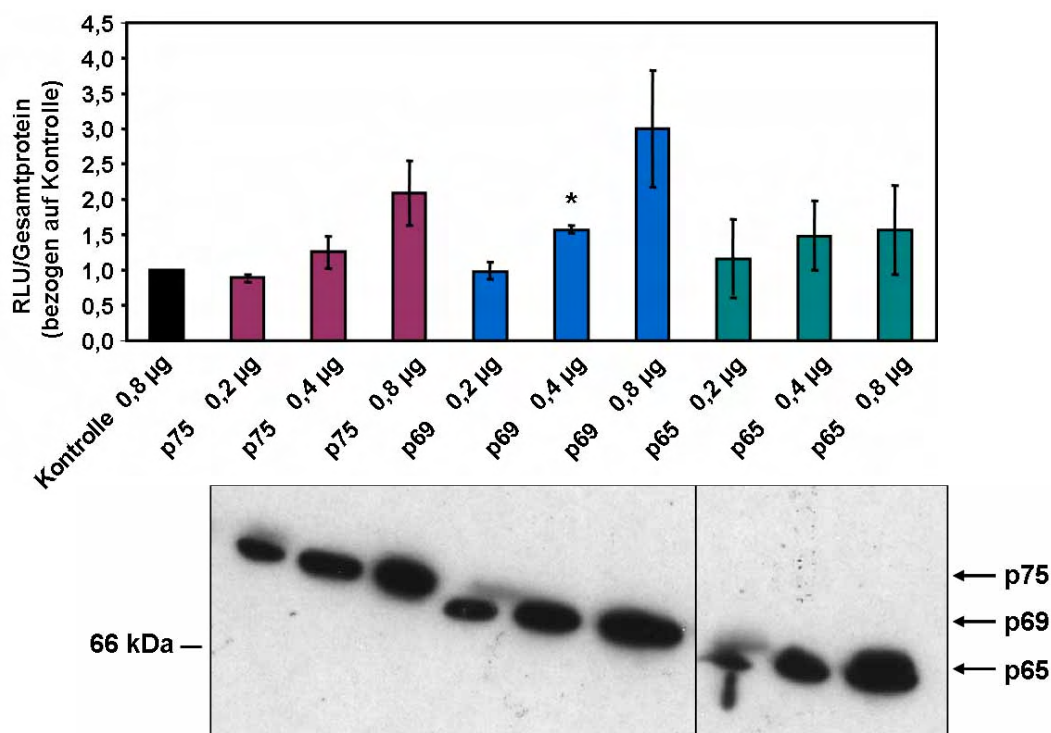


Abb. 3.39: Unterschiedlich starke Stimulation der FKHR-abhängigen Glukose-6-Phosphatase-Promotoraktivität durch DYRK1B-Spleißvarianten in COS-7-Zellen

COS-7-Zellen (100.000/6-Well) wurden mit dem Glukose-6-Phosphatase-Promotor als Reporteragen-Konstrukt (0,6 µg), FKHR-Plasmid (0,2 µg) und pCMV•SPORT6-DYRK1B-p75 (s. S. 27), -p69 bzw. -p65 (unsere Arbeitsgruppe) oder/und Kontrolle (pCMV•SPORT6; max. 0,8 µg) in je 2 Wells transient transfiziert. Nach 2 Tagen erfolgten Lyse und Messung der RLU mit dem „Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer“. Die RLU wurden auf Gesamtprotein normiert. Angegeben sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen \pm SEM. Als Bezug diente der Mittelwert der mit 0,8 µg Kontrolle transfizierten Zellen. *: signifikant ($p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle. Die Überexpression der jeweiligen Spleißvariante wurde in vereinigten Aliquots der Lysate zweier identisch transfizierter Wells eines Versuches (ca. 6 µg Gesamtprotein) nach 8%-SDS-PAGE mit DYRK1B-Antiserum im Western blot kontrolliert.

3.9.3 Erzeugung von DYRK1B-p65, -p69 bzw. -p75 stabil überexprimierenden NIH-3T3-Zellen

Um beispielsweise zu untersuchen, ob die drei Spleißvarianten DYRK1B-p65, -p69 und -p75 die Lebensfähigkeit von Zellen bei Serumentzug erhöhen, wurde die murine NIH-3T3-Fibroblasten-Zelllinie mit Hilfe von Retroviren mit der cDNA je einer DYRK1B-Spleißvariante stabil transfiziert. Die Produktion der Retroviren erfolgte in der mit pWZL-neo-DYRK1B-p65, -p69 bzw. -p75 transient transfizierten Zelllinie Phoenix™ (Abb. 3.40 A). Nach der Infektion von NIH-3T3-Fibroblasten mit den transgenen Retroviren wurde die stabile Transfektion der Nagetierzellen mit pWZL-neo-DYRK1B-p65, -p69 bzw. -75 im *Western blot* nachgewiesen (Abb. 3.40 B).

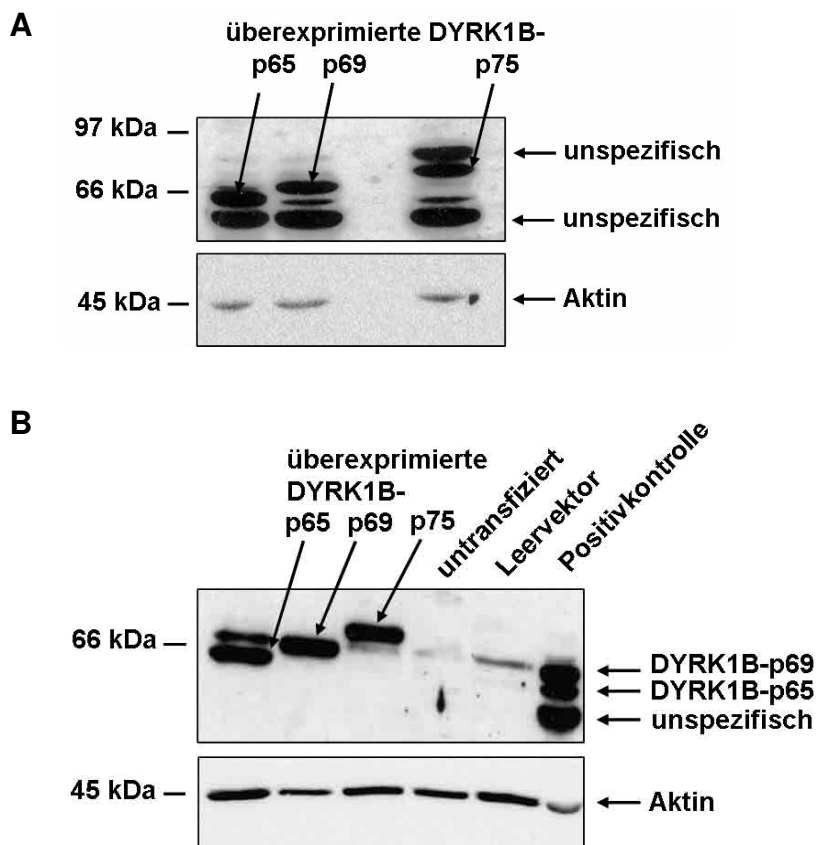


Abb. 3.40: Überexprimierte DYRK1B-Spleißvarianten in Phoenix™- bzw. NIH-3T3-Zellen

A: Die transiente Überexpression von DYRK1B-p65, -p69 bzw. -p75 in Phoenix™-Zellen wurde nach 8%-SDS-PAGE mit DYRK1B-Antiserum im *Western blot* kontrolliert.

B: Die durch retrovirale Infektion erzielte stabile Überexpression von DYRK1B-p65, -p69 bzw. -p75 in NIH-3T3-Zellen wurde nach 8%-SDS-PAGE mit DYRK1B-Antiserum im *Western blot* kontrolliert. Leervektor: pWZL-neo; Positivkontrolle: transient überexprimierte DYRK1B-p69 in Phoenix™-Zellen (s. **A**). Aktin diente in A und B als Ladungskontrolle.

Im Gegensatz zu INS-1-Zellen exprimierten NIH-3T3-Zellen keine DYRK1B-p75. Dies wurde sowohl in denaturierten Lysaten als auch nach DYRK1B-Immunpräzipitation nativer Lysate im *Western blot* mit DYRK1B-Antiserum nachgewiesen (Abb. 3.41 A und B). In einem Kinase-Assay ließen sich die katalytischen Aktivitäten endogener und überexprimierter DYRK1B nicht nachweisen. Hier katalysierte nur die als Positivkontrolle dienende GFP-DYRK1B-p69 in COS-7-Zellen die Phosphorylierung des synthetischen Peptides *DYRKtide*, einem optimierten Substrat von DYRK1A (Himpel *et al.*, 2000) (Daten nicht gezeigt).

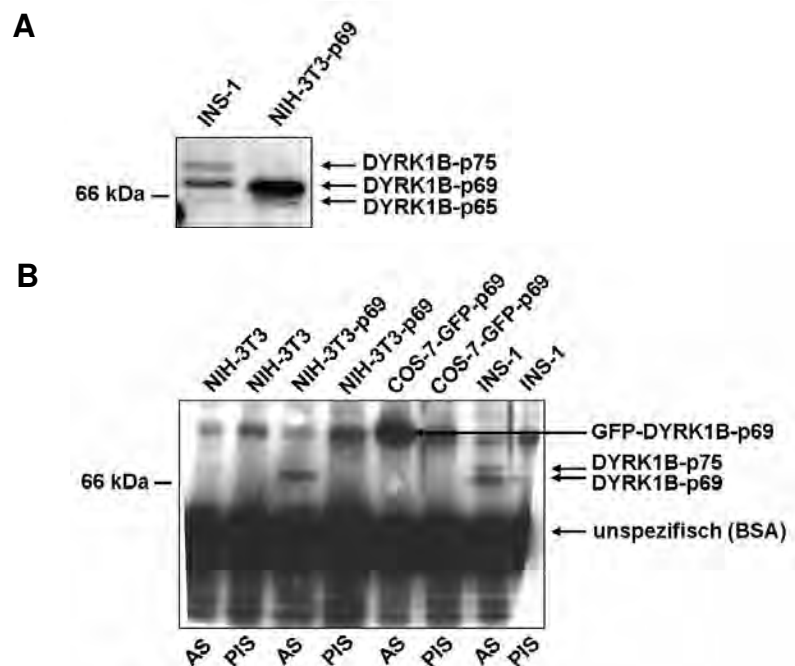


Abb. 3.41: DYRK1B-Spleißvarianten in den Zelllinien INS-1 und NIH-3T3

A: Im SDS-Lysat aus INS-Zellen wurden endogene DYRK1B-p65, -p69 und -p75, im SDS-Lysat aus DYRK1B-p69 stabil überexprimierenden NIH-3T3-Zellen dagegen nur endogene DYRK1B-65 und die überexprimierte p69 mit DYRK1B-Antiserum im *Western blot* nach 8%-SDS-PAGE nachgewiesen.

B: Endogene und überexprimierte DYRK1B-Spleißvarianten in nativen Lysaten aus NIH-3T3-Zellen (500 µg Gesamtprotein), 3 Tage vor der Lyse serumarm (1% FCS) kultivierten INS-1-Zellen (ca. 1000 µg Gesamtprotein), stabil DYRK1B-p69 überexprimierenden NIH-3T3-Zellen (500 µg Gesamtprotein) bzw. transient GFP-DYRK1B-p69 (pEGFP-C1-DYRK1B-p69; Leder (2001)) überexprimierenden COS-7-Zellen (ca. 250 µg Gesamtprotein) wurden mit DYRK1B-Antiserum immunpräzipitiert. Als Negativkontrolle (Hintergrund) diente die alternative Fällung mit unspezifischem DYRK1B-Prä-Immuneserum. Nachdem die enzymatische Aktivität der endogenen bzw. überexprimierten DYRK1B-Spleißvarianten in NIH-3T3- und INS-1-Zellen anhand der Phosphorylierung des synthetischen Peptides *DYRKtide* im Kinase-Assay nicht nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurden die präzipitierten Proteine aus dem Immunkomplex durch Denaturierung gelöst. Nach 8%-SDS-PAGE wurde die DYRK1B- bzw. GFP-DYRK1B-p69-Präzipitation mit DYRK1B-Antiserum im *Western blot* kontrolliert. AS: DYRK1B-Antiserum, PIS: unspezifisches DYRK1B-Prä-Immuneserum.

3.9.4 Erhöhte DYRK1A- und DYRK1B-Mengen bei Serumentzug

Der Entzug von Wachstumsfaktoren arretiert in U9-Kolonkarzinomzellen den Zellzyklus in der G₀/frühen G₁-Phase: mit sinkender ERK1/2 (MAP-Kinasen-)Aktivität wird der DYRK1B-Spiegel hochreguliert (Lee *et al.*, 2000).

Zur Untersuchung des DYRK1A- bzw. DYRK1B-Gehalts in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus wurden NIH-3T3-Zellen in serumhaltigem Zellkulturmedium (Normalmedium, „SH“) bis zu ca. 90 - 95% Konfluenz kultiviert („0 h“-Wert), woraufhin die eine Hälfte der Zellen auf den übrigen Platten ab diesem Zeitpunkt serumfrei („SF“), die andere Hälfte weiterhin serumhaltig kultiviert wurde. Nach 3, 9, 24, 48 bzw. 72 h wurden auch sie denaturierend lysiert und in *Western blots* analysiert. Denaturierte GT1-7-Zelllysate dienten als Positivkontrolle, da sie DYRK1A und die drei DYRK1B-Spleißvarianten exprimierten (Abb. 3.16 A, Abb. 3.38 B). Durch den Serumentzug wurden die Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Die Zellen, die wieder mit frischem Normalmedium versorgt wurden, durchliefen zunächst weiterhin den Zellzyklus, bis auch sie – durch Konfluenz-bedingte Kontaktinhibition – in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus arretiert wurden (Deng *et al.*, 2004). Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, dass die serumfrei gesetzten NIH-3T3-Zellen etwa gleich viel endogene DYRK1A bzw. DYRK1B-p69 exprimierten wie fast konfluente NIH-3T3-Zellen, die weiterhin mit Serum versorgt wurden.

Im Verlauf des dreitägigen Serumentzuges (Ruhephase der Zellen), nahm die DYRK1A- und DYRK1B-p69-Menge deutlich zu (Abb. 3.42 A und B).

Die Expression exogener DYRK1B-p69 (Abb. 3.42 C) und DYRK1B-p65 (Daten nicht gezeigt) in fast konfluent gewachsenen NIH-3T3-Zellen änderte sich hingegen unter Serumentzug nicht wesentlich und war ebenfalls vergleichbar mit den parallel dazu in serumhaltigem Medium weiterwachsenden NIH-3T3-DYRK1B-p69/-p65-Zellen. Da die stabile *DYRK1B-p65/-p69*-Expression durch den retroviralen Promotor im pWZL-neo-Plasmid kontrolliert wurde, deutet dieser Unterschied zwischen endogener und überexprimierter DYRK1B darauf hin, dass die Hochregulation von DYRK1B in der G₀- (bzw. frühen G₁-)Phase des Zellzyklus transkriptionell (Deng *et al.*, 2003; Mercer & Friedman, 2006), d. h. über die Stimulation ihrer Promotoraktivität, reguliert wird.

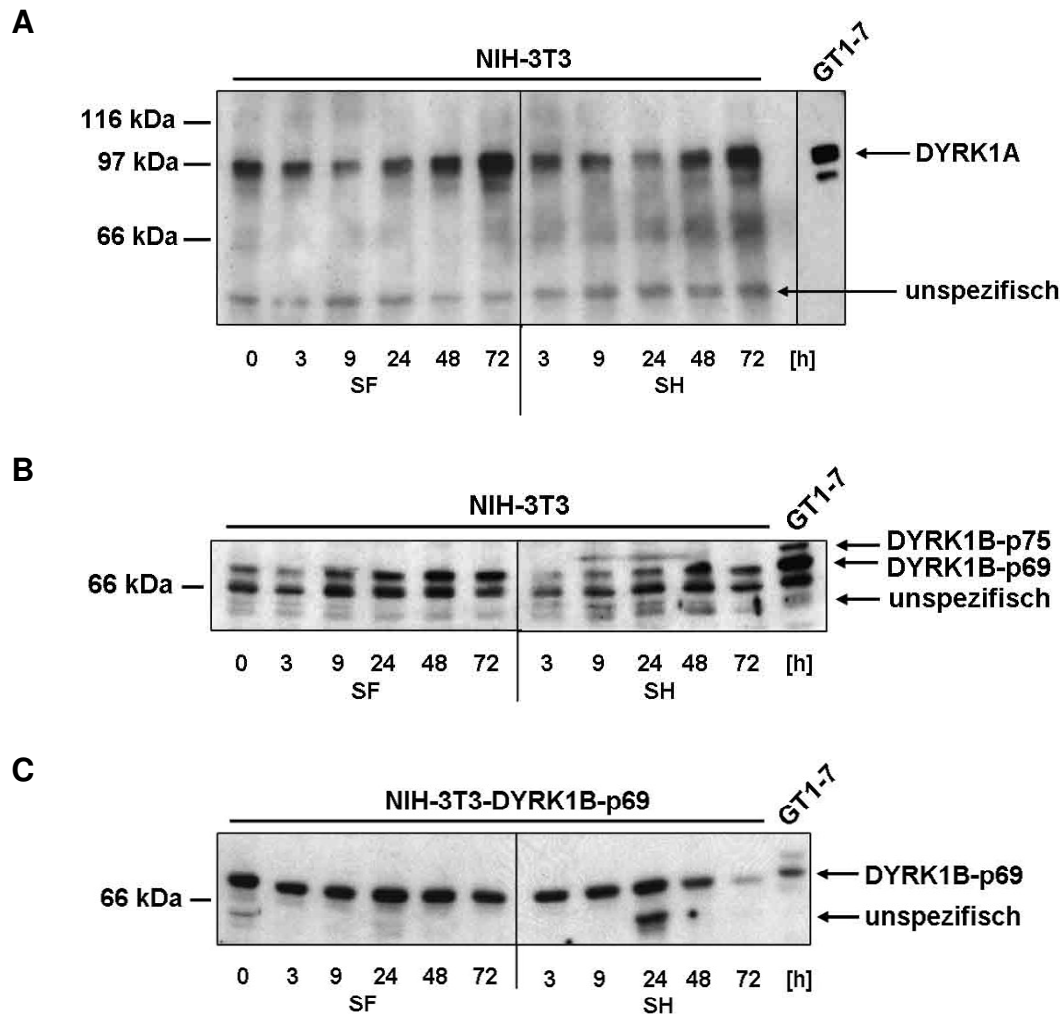


Abb. 3.42: Erhöhte DYRK1A- und DYRK1B-p69-Mengen in NIH-3T3-Zellen bei Serumentzug

A: Fast konfluente NIH-3T3-Zellen auf 6 cm-Platten wurden in 400 µl Lysepuffer denaturierend lysiert („0 h“), wohingegen die übrigen Zellen entweder in Normalmedium (SH) oder in serumfreiem DMEM-Medium weiterkultiviert wurden und nach 3, 9, 24, 48 bzw. 72 h analog lysiert wurden. Nach Gesamtproteinbestimmung und -angleich wurden die Lysate (ca. 7 µg Gesamtprotein) in einem 8%-SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit DYRK1A-Antikörper im *Western blot* mit Hilfe des „ECL AdvanceTM Western Blotting Detection Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben detektiert. Ein SDS-Lysat aus GT1-7-Zellen diente als Positivkontrolle. Ein ähnliches Ergebnis lieferte ein weiterer Versuch.

B/C: Fast konfluente NIH-3T3-Zellen (**B**) bzw. DYRK1B-p69 überexprimierende NIH-3T3-Zellen (**C**) wurden wie die in **A** beschriebenen Zellen behandelt. Nach Gesamtproteinbestimmung und -angleich wurden die Lysate (**B**: ca. 12 µg; **C**: ca. 14 µg Gesamtprotein) in einem 8%-SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit DYRK1B-Antiserum im *Western blot* detektiert. Die Gelspur „72 h SH“ (**C**) enthielt offenbar weniger als 14 µg Gesamtprotein. Ein SDS-Lysat aus GT1-7-Zellen diente jeweils als Positivkontrolle. Diese Ergebnisse wurden jeweils in einem weiteren Versuch bestätigt.

Die Kolonkarzinom-Zelllinien U9 und HD3 proliferieren durch überexprimierte DYRK1B unter fünftägigem Entzug von Wachstumsfaktoren stärker als die entsprechenden Zelllinien mit endogener DYRK1B (Lee *et al.*, 2000). Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auch in Fibroblasten auftritt, wurde der Einfluss überexprimierter im Vergleich zu endogener DYRK1B-p69 auf die Lebensfähigkeit von NIH-3T3-Zellen in Normalmedium (SH) bzw. bei Serumentzug (SF) untersucht. NIH-3T3-Zellen bzw. DYRK1B-p69 stabil überexprimierende NIH-3T3-Zellen (NIH-3T3-DYRK1B-p69) wurden in zwei unterschiedlichen Zelldichten ausgesät. Einen Tag später („0 Tage“-Wert) wurde die Lebensfähigkeit bzw. Proliferation der Zellen in einem WST-Assay gemessen. Die Zellen auf den übrigen Platten erhielten nun erneut serumhaltiges bzw. erstmals serumfreies Zellkulturmedium und wurden ein bis fünf Tage später ebenso getestet.

Im Gegensatz zu U9- und HD3-Kolonkarzinomzellen (Lee *et al.*, 2000) nahm die (Über-)Lebensfähigkeit serumfrei wachsender NIH-3T3-Fibroblasten durch exogene DYRK1B-p69 im Vergleich zur endogenen DYRK1B-p69 nicht zu (Abb. 3.43 B). Die (OD - *Blank*-)Werte von NIH-3T3-DYRK1B-p69-Zellen in der höheren Zelldichte, die vier bzw. fünf Tage unter serumfreien Bedingungen kultiviert worden waren, ließen sich nicht reproduzieren (Daten nicht gezeigt) und stellten somit Ausreißer dar. Auch DYRK1B-p75 stabil überexprimierende NIH-3T3-Zellen überlebten den mehrtägigen Serumentzug nicht (Daten nicht gezeigt). Ob der Serumentzug die Zellen wirklich in der G₀/G₁-Phase arretierte, wurde nicht untersucht, wird aber von Deng und Kollegen (2004) für NIH-3T3-Zellen beschrieben.

Auch unter normalen Wachstumsbedingungen, d. h. wenn die NIH-3T3-Zellen mit Serum versorgt wurden und den Zellzyklus normal durchliefen, erhöhte überexprimierte DYRK1B-p69 die Lebensfähigkeit der Zellen im Vergleich zur endogenen DYRK1B-p69 nicht (Abb. 3.43 A).

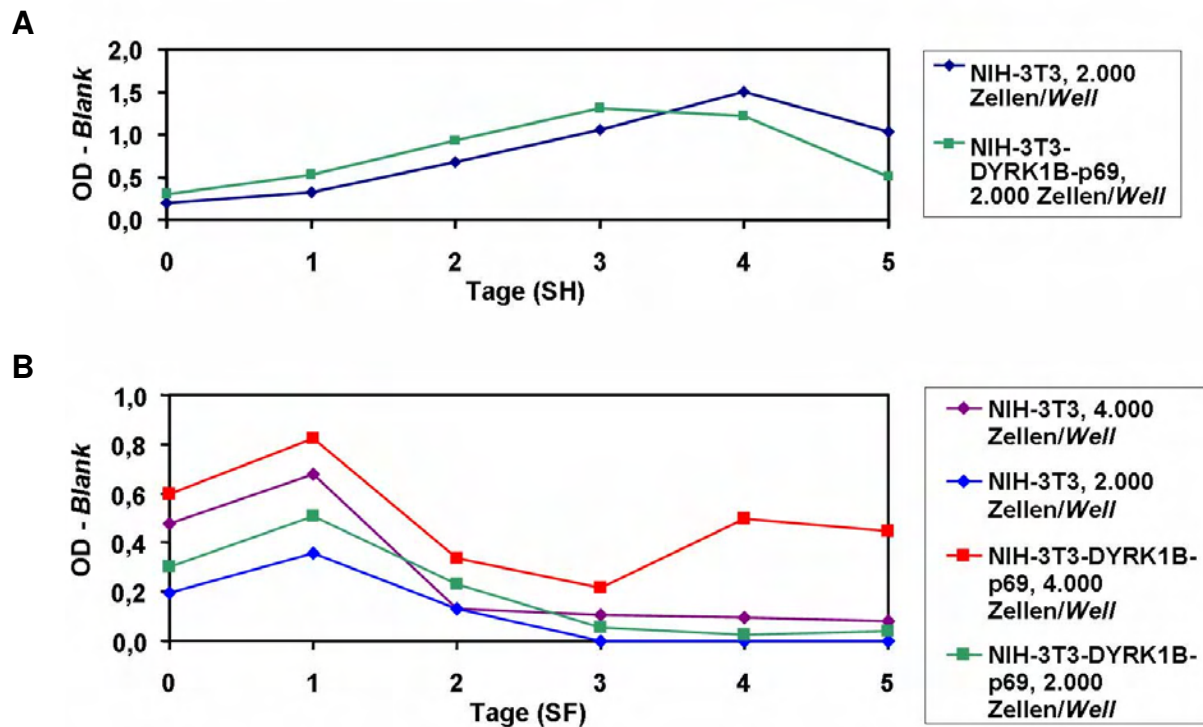


Abb. 3.43: Lebensfähigkeit von NIH-3T3-Zellen mit endogener bzw. exogener DYRK1B-p69 in Normalmedium bzw. bei Serumentzug

A: Die Lebensfähigkeit von 2.000 NIH-3T3- bzw. NIH-3T3-DYRK1B-p69-Zellen/96-Well wurde am Tag nach der Aussaat im WST-Assay bestimmt („0 Tage SH/SF“): photometrische Messung der OD nach 1 h WST-1/ECS. Die übrigen Zellen erhielten nun frisches Medium. Nach 1, 2, 3, 4 bzw. 5 Tagen folgten weitere WST-Assays. Es handelte sich um eine Einzelbestimmung (je 1 Well), deren Tendenz sich in einem weiteren Versuch mit 4.000 bzw. 8.000 Zellen/Well bestätigte (Daten nicht gezeigt). OD: Optische Dichte, Blank (Hintergrundwert): Normalmedium.

B: Die Lebensfähigkeit von 2.000 bzw. 4.000 NIH-3T3- bzw. NIH-3T3-DYRK1B-p69-Zellen/96-Well wurde am Tag nach Aussaat im WST-Assay bestimmt („0 Tage SH/SF“, vgl. A). Die übrigen Zellen erhielten nun serumfreies Medium. Nach 1, 2, 3, 4 bzw. 5 Tagen folgten weitere WST-Assays. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 2 identisch behandelten Wells. Kurven mit ähnlicher Tendenz wurden in einem weiteren Versuch mit 4.000 bzw. 8.000 Zellen/Well erhalten (Daten nicht gezeigt). Die (OD - Blank)-Werte für NIH-3T3-DYRK1B-p69 (4.000 Zellen/Well) nach vier- bzw. fünftägigem Serumentzug stellten Ausreißer dar. Blank: serumfreies DMEM-Medium.

4. Diskussion

4.1 Promotoren des *DYRK1A*-Gens

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Charakterisierung der Promotorregion und der transkriptionellen Regulation des humanen *DYRK1A*-Gens.

Identifizierung der Transkriptionsstarts A und B des *DYRK1A*-Gens

Das *DYRK1A*-Gen besitzt in der humanen Prostataadenokarzinom-Zelllinie PC-3 zwei durch 5'-RACE-PCR identifizierte alternative Transkriptionsstarts A und B (TS A und TS B). Die 5'-flankierenden Sequenzbereiche der jeweiligen Exons 1A und 1B weisen voneinander unabhängige Promotoraktivitäten auf, d. h. die Transkription des *DYRK1A*-Gens wird – zumindest in den untersuchten Tumorzelllinien PC-3, SAOS-2 (humanes Osteosarkom) und PC-12 (Phäochromozytom der Ratte) – durch zwei alternative Promotoren A und B reguliert (s. S. 68 - 69, Abb. 3.44 C).

TS A wird in der Literatur noch nicht beschrieben. TS B dagegen entspricht dem von Guimerà und Kollegen (1999) mit RACE-PCR und cDNA-Bibliotheken-Screening identifizierten Transkriptionsstart des Transkripts *MNBHa* (GenBank®-Nr. AF108830) in Exon2G (Bezeichnung in Anlehnung an Guimerà und Kollegen (1999)) (Abb. 3.44 A und C). Die differentielle Expression von *MNBHa* und ihrer Variante *MNBHb* (Abb. 3.44 B), die – im Gegensatz zu *MNBHa* – als ein einziger RACE-Klon (gesamter Fötus) identifiziert wurde, wird in *Northern blots* deutlich: während *MNBHa* in verschiedenen adulten Geweben und in allen untersuchten fötalen Gehirngeweben, d. h. ubiquitär, exprimiert wird, ist *MNBHb* mit Start in Exon1G nur im adulten Herz- und Skelettmuskel nachweisbar, nicht jedoch z. B. in den untersuchten fötalen Gehirngeweben (Guimerà *et al.*, 1999). Laut CAGE-Tag-Analyse der *DYRK1A*-Promotorregion starten 31 Transkripte ohne Gewebsspezifität innerhalb 31 bp *upstream* von TS A und 11 solcher Transkripte binnen 36 bp *upstream* von TS B, aber in den CAGE-Bibliotheken (ohne Herz- und Skelettmuskelgewebe) liegt kein Transkriptionsstart in Exon1G (Abb. 3.1). Die ca. 800 bp umfassende 5'-flankierende Sequenz von Exon1G besitzt weder in COS-7-Zellen (Niere der Afrikanischen Grünen Meerkatze) noch in SAOS-2-Zellen Promotoraktivität (s. S. 67). Dies spricht dafür, dass *MNBHb* im Gegensatz zu *MNBHa* gewebsspezifisch ist.

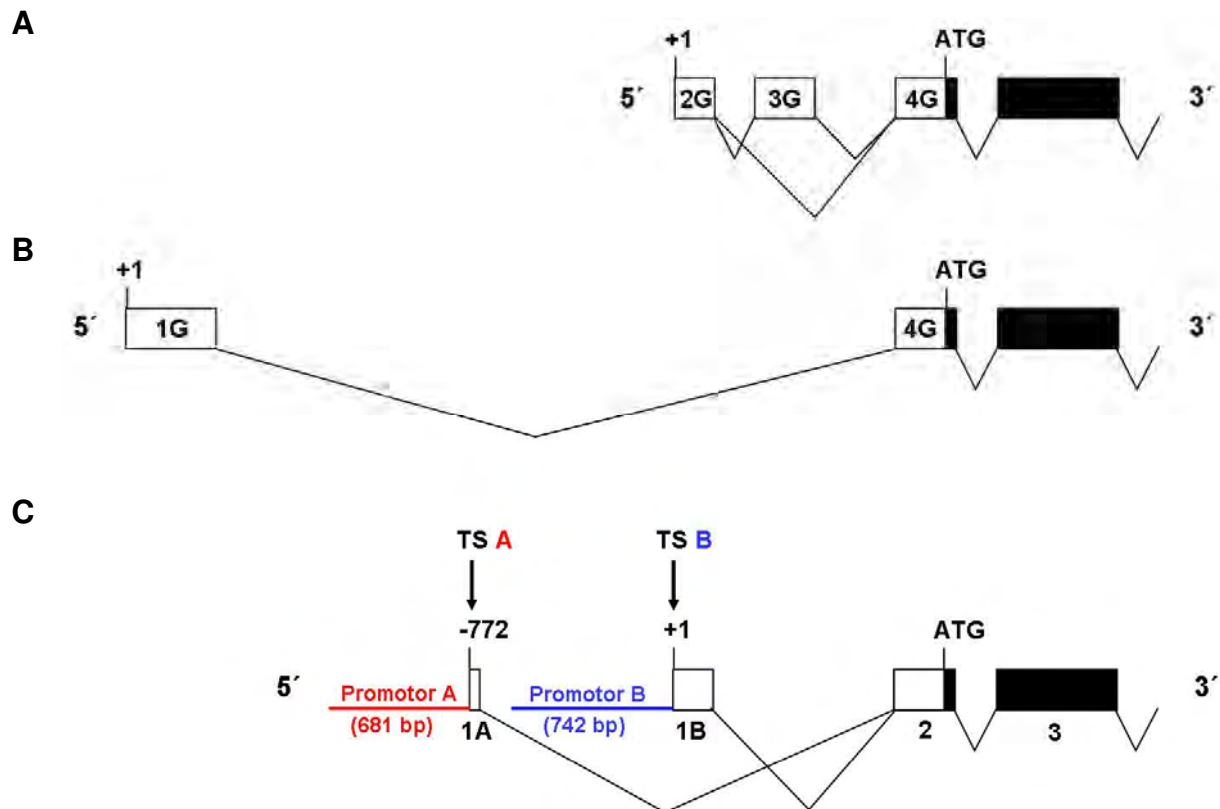


Abb. 3.44: Alternatives Spleißen der 5'-Region der *DYRK1A*-Prä-mRNA

A: Schematische Darstellung der *DYRK1A*-Spleißvariante *MNBHa*, die ubiquitär exprimiert wird (Guimerà *et al.*, 1999). Die nicht-kodierenden Exons sind durch weiße Kästen dargestellt und nummeriert wie von Guimerà und Kollegen (1999), wobei G für Guimerà steht. Kodierende Regionen sind schwarz dargestellt. Der Translationsstart ist mit dem ersten kodierenden Basentriplett ATG gekennzeichnet. Die Verbindungen zwischen den Exons stellen Introns dar.

B: Das Transkript *MNBHb* dagegen ist nur für Herz und Skelettmuskel typisch (Guimerà *et al.*, 1999). Die Beschriftung dieser schematischen Darstellung ist analog zu **A**.

C: Schema des alternativen Spleißens der *DYRK1A*-Prä-mRNA der humanen Zelllinie PC-3, in der mittels 5'-RACE-PCR zwei unterschiedliche Transkriptionsstarts A und B (TS A und TS B) in zwei alternativen Exons 1A und 1B identifiziert wurden. Die jeweils 5'-flankierenden Regionen wiesen Promotoraktivitäten auf und wurden als Promotor A (rot) bzw. Promotor B (blau) bezeichnet. Die nicht-kodierenden Exons sind durch weiße Kästen, die kodierenden Bereiche sind schwarz dargestellt. Die Nummerierung der Exons orientiert sich an dem Exon, in dem TS A liegt. Der Translationsstart ist mit dem ersten kodierenden Basentriplett ATG gekennzeichnet. Die Verbindungen zwischen den Exons stellen Introns dar.

Im Gegensatz zu *DYRK1B* (Leder *et al.*, 2003) entstehen durch das alternative Spleißen der *DYRK1A*-Prä-mRNA keine unterschiedlichen Protein-Spleißvarianten, da der Translationsstart im Exon 2 (Exon4G nach Guimerà und Kollegen (1999)) der *DYRK1A*-Prä-mRNA vom Spleißen unberührt bleibt (Abb. 3.44 C). Deshalb stellt *DYRK1A* eine Besonderheit dar: es gehört zu den geschätzten 7,1% der mindestens zwei Transkriptionsstarts enthaltenden Gene, deren Translationsstart in allen oder den meisten Transkripten gleich ist und die nicht gewebsspezifisch (nachgewiesene Ausnahme: *MNBHb*) transkribiert werden (Carninci *et al.*, 2006). Obwohl die unterschiedlichen Aktivitäten der *DYRK1A*-Promotoren A und B (s. S. 68 - 69) eine differentielle, gewebesabhängige Promotornutzung vermuten lassen, lässt die CAGE-Tag-Analyse eine breite Gewebsverteilung beider Transkripte erkennen (Abb. 3.3).

CAGE-Tag-Analyse der Promotorregion des *DYRK1A*-Gens

Die Komplexität der „Transkriptlandschaft“ von Säugetieren wird beispielsweise daran deutlich, dass das „Transkriptom“ mindestens zehnmal größer als die Anzahl der Gene ist (Carninci *et al.*, 2005). Die CAGE (Cap Analysis of Gene Expression)-Tag-Analyse in Kombination mit der Kartierung von cDNAs, ESTs, GIS (Gene Identification Signature)- und GSC (Gene Signature Cloning)-Tags soll der genomweiten Analyse von Transkription und transkriptioneller Genregulation und damit der „systematischen“ Systembiologie dienen (Carninci *et al.*, 2006).

Die breite Verteilung der 55 verschiedenen, durch CAGE-Tag-Analyse erhaltenen *DYRK1A*-Transkriptionsstarts der 141 *DYRK1A*-Transkripte innerhalb der 1.700 bp langen Nukleotidsequenz *upstream* von TS B (Abb. 3.1) lässt die vielfältigen Möglichkeiten der transkriptionellen Regulation von *DYRK1A* erahnen. Es existieren neun *Tag-Cluster* zwischen -900 bp und TS B, von denen zwei *Cluster* mit 7 bzw. 4 Transkriptionsstarts in diversen Geweben unmittelbar proximal zu den durch 5'-RACE-PCR in PC-3-Zellen ermittelten Transkriptionsstarts A bzw. B liegen (in Abb. 3.3 rot bzw. blau markiert). Somit wird die Existenz von TS A und TS B durch die CAGE-Tag-Analyse gestützt.

Nimmt man eine Promotorklassifizierung nach Carninci und Kollegen (2006) vor (s. S. 66), so spricht das *Tag-Cluster upstream* von TS A für einen bimodalen Promotor mit zwei dominanten Transkriptionsstarts (MU-Klasse), die CAGE-Tags *upstream* von TS B verteilen sich breit mit einem dominanten Transkriptionsstart (PB-Klasse)

(Abb. 3.3). Fünf der neun einzelnen Datenbank-definierten *Tag-Cluster* der in der vorliegenden Arbeit charakterisierten *DYRK1A*-Promotorregion lassen sich in die MU- bzw. PB-Klasse mit breiter Gewebsverteilung einordnen (Carninci *et al.*, 2006). Die vier übrigen *Tag-Cluster* fallen eher in die Promotorkategorie SP, da sie innerhalb von ca. 1 bis 10 Basenpaaren nur einen einzigen dominanten Transkriptionsstart aufweisen. Darüberhinaus sind drei dieser vier *Cluster* gewebspezifisch, d. h. die Transkripte darin stammen aus einem spezifischen CAGE-Gewebe. Vor diesen SP-*Clustern* liegt untypischerweise weder eine apparente TATA-Box (TATA(A/T)A(A/T)) (Breathnach & Chambon, 1981), noch eine CCAAT-Box (Benoist *et al.*, 1980; Efstratiadis *et al.*, 1980).

Unabhängig von der Promotorklasse ist ein Pyrimidin-Purin-Motiv oft charakteristisch für die Positionen -1/+1, wobei +1 den Transkriptionsstart markiert: C/G, C/A und T/G an -1/+1 sind bevorzugte Initiations-Dinukleotide und werden mit hoher transkriptioneller Aktivität assoziiert (Carninci *et al.*, 2006). In der Tat beginnen z. B. 27 von 31 *DYRK1A*-Transkripten unterschiedlicher Gewebe nahe TS A mit C/G (-1/+1). Auch TS B selbst und 2 von 13 *DYRK1A*-Transkripten unterschiedlicher Gewebe nahe TS B weisen dieses CG-Motiv auf (Abb. 3.1).

GC-Reichtum der *DYRK1A*-Promotoren A und B

Ungefähr 50% aller humanen Gene besitzen CpG-Inseln im Bereich ihrer Promotorregionen. In den meisten Fällen entgehen diese GC-reichen Nukleotidsequenzen (CpG/GpC-Verhältnis > 0,6) (Bird, 1986; Gardiner-Garden & Frommer, 1987) einer Cytosin-Methylierung, die ihre Aktivität aufheben würde (Neumann *et al.*, 1995). Methylierte CpG-Inseln existieren jedoch auf einem der beiden weiblichen X-Chromosomen und häufig in Krebszellen (Yamada *et al.*, 2004).

Im Rahmen einer Analyse des allelischen Methylierungszustandes von CpG-Inseln auf dem humanen Chromosom 21 wurde *in silico* und mittels PCR eine unmethylierte CpG-Insel mit einem GC-Gehalt von 95% über eine Länge von 2.103 bp in der *DYRK1A*-Promotorregion um TS B herum nachgewiesen (Yamada *et al.*, 2004) (Abb. 3.1). Der Methylierungszustand des *DYRK1A*-Promotors A wurde jedoch nicht von Yamada und Kollegen (2004) untersucht.

Bei Promotor B handelt es sich um einen GC-reichen Promotor (74% G/C innerhalb von 742 bp) ohne TATA-Box; Promotor A enthält eine TATA-Box-ähnliche Struktur

und ist ebenfalls GC-reich (77% G/C innerhalb von 681 bp). Allgemein wird eine breite Verteilung von Transkriptionsstarts in einer GC-reichen Nukleotidsequenz mit ubiquitärer Gewebsverteilung des Transkripts in Verbindung gebracht, wohingegen TATA-Box-haltige Promotoren vom Typ SP die Genexpression in bestimmten Geweben regulieren (Carninci *et al.*, 2006). Eine Ausnahme bilden GC-reiche Promotoren, die ZNS-spezifisch sind. Die GC-reichen Promotoren kommen in Säugetieren häufiger als TATA-Box-haltige Promotoren vor. Es wird spekuliert, dass GC-reiche Promotoren mit multiplen Transkriptionsstarts durch epigenetische Regulation und spezifische Nutzung der Initiationssignale der Evolution von Vertebraten dienen (Carninci *et al.*, 2006). Die breite Verteilung der Transkriptionsstarts (Abb. 3.3) und der hohe GC-Gehalt in der *DYRK1A*-Nukleotidsequenz *upstream* von TS A bzw. B könnten die ubiquitäre *DYRK1A*-Expression (Becker *et al.*, 1998) erklären. Beide Promotoren sind beispielsweise in zwei humanen Zelllinien und einer Ratten-Zelllinie aktiv.

Unterschiedliche Aktivitäten der *DYRK1A*-Promotoren A und B

Promotor A ist in PC-12-Zellen ca. dreifach aktiver als Promotor B, in PC-3-Zellen ca. zehnfach aktiver und in SAOS-2-Zellen sogar ca. vierzehnfach aktiver als Promotor B (s. S. 68 - 69). Eine Erklärung hierfür könnten fünf potentielle Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors Sp-1 (GGGCGG bzw. CCGCCC) (Araki *et al.*, 1987) in Promotor A sein, wohingegen Promotor B nur vier dieser Konsensussequenzen enthält (Abb. 3.1). Denn der Transkriptionsfaktor Sp-1 kann nach Bindung an solche GC-Box-Promotorelemente die Transkriptionsrate des entsprechenden Gens durch die RNA-Polymerase II zehn- bis fünfzigfach erhöhen (Briggs *et al.*, 1986; Kadonaga *et al.*, 1987).

Die Basalaktivitäten von -742, -647, -541, -418 bzw. -324 bp in Bezug auf TS B sind in SAOS-2-Zellen recht konstant, nehmen jedoch bei 5'-Deletion auf 226 bp bzw. 114 bp um ca. 90% ab. Möglicherweise bindet der Transkriptionskomplex aufgrund der CpG-Insel, d. h. eventueller „Haarnadel“-Struktur, von -285 bp *downstream* bis weit hinter TS B nur schwach an die 226 bp lange Nukleotidsequenz *upstream* von TS B, wohingegen an die ca. 100 bp lange Nukleotidsequenz zwischen -227 bp und -324 bp ein oder mehrere Transkriptionsfaktoren binden könnten, die die Basalaktivität des *DYRK1A*-Promotors B bestimmen. Die Tatsache, dass die Promotoraktivität

zwischen -324 bp und -418 bp nicht weiter zunimmt, sondern 324 bp bereits die basale Aktivität von Promotor B vermitteln, deutet darauf hin, dass Sp-1 nicht an das GC-Box-Element GGGCGG in dieser Region bindet (Abb. 3.5, Abb. 3.1).

In Gegenwart der beiden Transkriptionsstarts A und B steigt die Promotoraktivität sprunghaft auf das Fünf- bis Siebenfache von Promotor B an. Dies deutet darauf hin, dass diese Konstrukte über Transkriptionsstart A reguliert werden. Mit einer mutmaßlichen Bindung von hemmenden (Transkriptions-)Faktoren im Sequenzbereich zwischen TS A und TS B, der im Promotor A-Konstrukt fehlt, lässt sich erklären, warum Promotor A in SAOS-2-Zellen ca. doppelt so aktiv ist wie die Sequenzbereiche von *DYRK1A*, die TS A und TS B enthalten. Die ersten 67 bp des Promotors A vermitteln bereits eine deutliche Aktivität dieses Promotors (Abb. 3.5, Abb. 3.1).

Die Expression vieler Gene wird durch alternative Promotoren reguliert. So werden beispielsweise das Glukokinase-Gen (Magnuson & Shelton, 1989) und das Aromatase-Gen durch gewebsspezifische Promotoren reguliert (Simpson, 2004); die Expression des *Pax6*-Gens kontrollieren entwicklungsabhängige Promotoren (Plaza *et al.*, 1995; Plaza *et al.*, 1999).

5'-RACE-PCR, CAGE-Tag-Analyse und Reporter-Gen-Assays zufolge existieren zwei alternative Transkriptionsstarts bzw. Promotoren des *DYRK1A*-Gens. Da die Promotoren A und B in mehreren Säugetier-Zelllinien aktiv sind, konzentriert sich die vorliegende Promotorstudie auf diese beiden Promotoren.

4.2 *DYRK1A*-Expression im Zellzyklus

4.2.1 *DYRK1A* – ein Zielgen des Transkriptionsfaktors E2F1?

Die Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren spielt eine zentrale Rolle im Zellzyklus. Unter physiologischen Bedingungen reguliert E2F1 die Expression von Genen hoch, deren Produkte für die Zellzykluskontrolle (z. B. DNA-Synthese) wichtig sind (z. B. *CCNE* für Cyclin E, *TS* für Thymidylatsynthase). Nach einer DNA-Schädigung stimuliert E2F1 beispielsweise die Expression von Apoptosegenen (z. B. *Apaf1*, *TP73*), aber auch von DNA-Schädigung-responsiven Kinasen (z. B. ATM, Chk1) im Rahmen einer positiven *Feedback*-Schleife, was zum Anhalten des Zellzyklus bzw.

zu Apoptose führt. Außerdem wird spekuliert, dass E2F1 durch Interaktion mit anderen Proteinen (z. B. BRCA1, TopBP1) an der Erkennung und Reparatur von DNA-Strangbrüchen und an der Kontrolle der DNA-Replikation beteiligt ist (Stevens & La Thangue, 2004). Da in Tumorzellen zwar häufig Mutationen in den Genen auftreten, die Rb oder/und p53 kodieren, aber nicht im *E2F1*-Gen, wird vermutet, dass E2F1 eine wesentliche Rolle in Krebszellen spielt (Stevens & La Thangue, 2004). Die meisten humanen Tumoren weisen aberrante (erhöhte) Transkriptmengen E2F(1)-regulierter Gene auf, weil alle bekannten Mutationen im Rb/E2F(1)-Signalweg zu deregulierter E2F(1)-Aktivität führen (Müller *et al.*, 2001).

In „*High density oligonucleotide microarrays*“ und *Northern blots* wurde sowohl in asynchronen Populationen exponentiell wachsender U2OS-Zellen (Müller *et al.*, 2001) als auch in murinen NIH-3T3-Fibroblasten in der G₀-Phase (Ma *et al.*, 2002) *DYRK1A* als *Target*-Gen des überexprimierten Transkriptionsfaktors E2F1 identifiziert. Der endogene Transkriptionsfaktor E2F1 wird nämlich am G₁/S-Phasen-Übergang und in der frühen S-Phase exprimiert, sodass exogenes E2F1 diese beiden Zelltypen in die S-Phase überführt bzw. dort stabilisiert (Ma *et al.*, 2002). Bei U2OS handelt es sich um eine humane Osteosarkom-Zelllinie, die – im Gegensatz zu SAOS-2 – funktionelles Rb und p53 exprimiert.

Eine Hochregulation des bekannten E2F1-*Target*-Gens *DHFR* (Dihydrofolatreduktase) (Blais & Dynlacht, 2004) und der *DYRK1A*-mRNA durch überexprimiertes E2F1 ist auch in den humanen Zelllinien SAOS-2 (ca. 1,6-fach) und PhoenixTM (HEK 293T-ähnliche Zelllinie) nachweisbar (Abb. 3.24 A und B). Dies deutet darauf hin, dass E2F1 die *DYRK1A*-Expression unabhängig vom Rb- und p53-Status der Zelle reguliert.

In SAOS-2-Zellen aktiviert der induzierte Transkriptionsfaktor E2F1 selektiv *DYRK1A*-Promotor B ca. 2,5-fach, möglicherweise aufgrund einer Bindung innerhalb der 226 bp langen und zwei mutmaßliche E2F1-Bindungsstellen enthaltenden Nukleotidsequenz *upstream* von Transkriptionsstart B. *DYRK1A*-Promotor A ist im Gegensatz zu Promotor B nicht E2F1-responsiv und enthält auch keine möglichen Bindungsstellen für E2F1 (Abb. 3.27, Abb. 3.1). Ob *DYRK1A* ein direktes Zielgen von E2F1 ist, oder ob die beschriebenen Effekte durch ein anderes Protein in der S-Phase vermittelt werden, muss noch erforscht werden.

Desweiteren ist noch unklar, warum in PhoenixTM-Zellen überexprimiertes E2F1 nicht auch die *DYRK1A*-Proteinmenge deutlich erhöht (Abb. 3.28). Vielleicht lässt sich dies

auf apoptotische Vorgänge zurückführen, denn nach zweitägiger E2F1-Überexpression reduzierte sich die Zahl der PhoenixTM-Zellen. Man geht davon aus, dass Apoptose ein Ergebnis höherer E2F1-Konzentrationen sein kann, denn exogene E2F1-Expression kann sowohl p53-abhängige als auch p53-unabhängige Apoptose auslösen (Dyson, 1998; Denchi & Helin, 2005).

Der Rb/E2F-Signalweg ist nicht nur von Bedeutung für Zellproliferation und Apoptose, sondern steht auch im Fokus bei Differenzierung und früher Entwicklung: der Transkriptionsfaktor E2F1 reguliert beispielsweise die Expression des Transkriptionsfaktors HEY1 (*Hairy/Enhancer of split related with YRPW motif 1*) hoch (Müller *et al.*, 2001; Leimeister *et al.*, 1999). Es ist vorstellbar, dass die durch E2F1 hochregulierte *DYRK1A*-Expression während der G₁/S-Phase des Zellzyklus beispielsweise die Neurogenese fördert.

4.2.2 *DYRK1A* – ein Fluorouracil-responsives Gen mit variablem

Expressionsmuster in humanen Tumorzellen bzw. Tumorzelllinien

Der „Cancer Profiling Array I“ und der „Cancer Cell Line Profiling Array“ (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA) verdeutlichen eine starke Variation der *DYRK1A*-mRNA-Menge von Patient zu Patient – sowohl in gesundem Gewebe, als auch in Tumor- und Metastasengewebe – bzw. in Tumorzelllinien. So exprimieren offenbar die Prostataadenokarzinom-Zelllinie PC-3 (*TP53* -/-) und die Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 (*TP53* -/-) mehr *DYRK1A* als beispielsweise die Prostatakarzinom-Zelllinie DU 145 (mutiertes *TP53*) oder die Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 (*TP53* +/-) (Abb. 3.10). Ein Reporter-gen-Assay in *TP53* überexprimierenden PC-3-Zellen deutet auf eine Korrelation von *TP53*-Mangel und hoher *DYRK1A*-Expressionsrate hin (Abb. 3.18 A). Das *TP53*-Gen zählt zu den am häufigsten mutierten Genen humaner Tumoren und kodiert einen tumorsupprimierenden Transkriptionsfaktor (Nigro *et al.*, 1989; Hollstein *et al.*, 1991). Möglicherweise spielt *DYRK1A* in Krebszellen, die mutiertes oder gar kein *TP53* besitzen, eine wichtige Rolle bei proliferativen Vorgängen.

Der S-Phase-Inhibitor 5-Fluorouracil (5-FU) (Abb. 3.9) reguliert speziell in PC-3-Zellen die *DYRK1A*-mRNA hoch (Abb. 3.10). 5-FU stellt ein *Prodrug* dar, dessen Metabolit Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP) die Thymidylatsynthase (TS)

inhibiert, sodass die DNA-Synthese gehemmt wird. Außerdem werden die 5-FU-Metaboliten Fluorouridintriphosphat (FUTP) bzw. Fluorodesoxyuridintriphosphat (FdUTP) in die RNA bzw. die DNA schnell wachsender Zellen eingebaut, sodass diese so geschädigt werden, dass sie nicht mehr funktionstüchtig sind (Longley *et al.*, 2003).

Eine deutliche zeit- und dosisabhängige Stimulation der *DYRK1A*-Expression unter 5-FU-Behandlung wird auch in *Northern blots* in PC-3-Zellen und den *TP53*-exprimierenden HEK 293T-ähnlichen PhoenixTM-Zellen nachgewiesen (Abb. 3.11 bis Abb. 3.13). Sie kann vermutlich mit einer Stabilisierung, d. h. einem verminderten Abbau der kurzlebigen *DYRK1A*-mRNA (s. S. 103 - 106) erklärt werden, da die Aktivität bei der *DYRK1A*-Promotoren unter 5-FU nicht zunimmt (Abb. 3.15). Eine DNA-Schädigung durch UV-Strahlung führt in humanen Osteosarkom-Zelllinien – unabhängig vom p53- und Rb-Status – zu einer Induktion des E2F1-Proteins, welches allerdings seine transkriptionelle Aktivität einbüßt (O'Connor & Lu, 2000). Da auch 5-FU aufgrund seiner DNA-schädigenden Wirkung möglicherweise E2F1 stabilisiert und inaktiviert, könnte dies zwar erklären, warum die Aktivitäten von Promotor A und B durch 5-FU nicht ansteigen. Allerdings dürfte keine erhöhte *DYRK1A*-Expression im *Northern blot* nachweisbar sein, wenn 5-FU über E2F1 wirken sollte.

Es ist vorstellbar, dass *DYRK1A* in Analogie zur Proteinkinase PDPK F_A (*Proline-Directed Protein Kinase F_A*) eine wichtige Rolle bei der Regulation der „multiple drug resistance“ humaner Prostataadenokarzinomzellen (Yang *et al.*, 2000) spielt. Auch das Gen *MAT8*, das einen Chloridionentransporter kodiert, wird in einer 5-FU-resistenten Kolonkrebs-Zelllinie zeit- und dosisabhängig durch 5-FU hochreguliert und könnte einen guten Biomarker für 5-FU-Resistenz darstellen (Longley *et al.*, 2003). Sowohl PC-3- als auch PhoenixTM-Zellen proliferieren unter 5-FU weniger als die Kontrollzellen. Allerdings werden PhoenixTM-Zellen – im Gegensatz zu PC-3-Zellen – offenbar durch 5-FU in ihrer Morphologie deutlich geschädigt, was möglicherweise ein Zeichen von Apoptose ist (Abb. 3.14 A und B). Vielleicht besteht wirklich ein Zusammenhang zwischen p53-Mangel und 5-FU-Resistenz bzw. geringer Apoptoserate (Boyer *et al.*, 2004).

Die Hochregulation der *DYRK1A*-mRNA durch 5-FU korreliert wider Erwarten nicht mit einer nachweisbaren Erhöhung des *DYRK1A*-Proteingehalts im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.16 A und B). 5-FU führt als Antimetabolit vermutlich zu einem unspezifischen Abbruch der DNA-Synthese und verminderter Zellproliferation, die sich

beispielsweise in einem Rückgang der Expression von Translationsproteinen bzw. Proteinstabilisatoren äußern könnten. In Analogie zur E2F1-Wirkung liegt auch die Bedeutung der durch 5-FU hochregulierten *DYRK1A*-mRNA in humanen Tumorzelllinien ohne die Folge einer erhöhten DYRK1A-Proteinmenge noch im Dunkeln. Es wird jedoch deutlich, dass DYRK1A nicht nur in proliferierenden (Kontroll-)Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus exprimiert wird, sondern auch speziell in der S-Phase des Zellzyklus (5-FU, bestätigt durch Anstieg der Phospho-Rb-Menge, Abb. 3.17; vgl. auch E2F1). Da DYRK1A möglicherweise in allen Phasen des Zellzyklus exprimiert wird, kann diese ubiquitäre Proteinkinase wohl sehr unterschiedliche zelluläre Prozesse steuern.

4.2.3 *DYRK1A* – ein Zielgen des Transkriptionsfaktors CREB?

Im Rahmen einer SACO (*Serial Analysis of Chromatin Occupancy*; Kombination aus Chromatinimmunopräzipitation und modifizierter SAGE)- und Affymetrix-Analyse cAMP-regulierter Gene in 12 bis 16 h serumfrei gewachsenen PC-12-Zellen (Phäochromozytom der Ratte) wurde *DYRK1A* als *Target*-Gen des Transkriptionsfaktors CREB (*cyclic AMP Response Element Binding Protein*) identifiziert: CREB bindet in PC-12-Zellen *downstream* von der *DYRK1A*-3'-UTR und reguliert infolge cAMP-Stimulus (Forskolin) die Expression eines *Dyrk1a*-Transkripts der Ratte (GenBank®-Nr. BI303285) hoch (Impey *et al.*, 2004).

Der Transkriptionsfaktor CREB reguliert nach Aktivierung durch zahlreiche Kinasen (z. B. DYRK1A (Yang *et al.*, 2001)) und Bindung an CBP (*CREB-Binding Protein*) (Cha-Molstad *et al.*, 2004) die Expression von etwa 5.000 humanen Genen (Conkright & Montminy, 2005). Die Phosphorylierung von CREB an Serin 133 ist zwar keine Voraussetzung für die Bindung an ein CRE (*cyclic AMP Response Element*) der *Target*-DNA, aber für die transkriptionelle Aktivität von CREB. Die Beteiligung an neuronaler Entwicklung/Plastizität (Lernen und Gedächtnis), Wachstumsfaktor-unabhängiger und -abhängiger Zellproliferation und Glukosehomöostase zeichnet den Transkriptionsfaktor CREB aus (Lonze & Ginty, 2002; Conkright & Montminy, 2005; Mayr & Montminy, 2001). Da CREB z. B. durch (indirekte) Hochregulation von Cyclin A1, das u. a. die DNA-Synthese initiiert, den Eintritt der Zelle in

die S-Phase des Zellzyklus forciert, ist eine Hochregulation der *DYRK1A*-Expression durch CREB in Analogie zu E2F1 durchaus vorstellbar.

CREB bindet in PC-12-Zellen in DNA-Retardierungs-Assays (EMSAs) spezifisch an das in *DYRK1A*-Promotor A lokalisierte CRE-Motiv 5'-GGACGTCA-3' (Abb. 3.1), allerdings schwächer als an die CRE-Konsensussequenz 5'-TGACGTCA-3' (Montminy *et al.*, 1986), und zwar unabhängig davon, ob die Zellen zuvor in Normalmedium oder ohne Serum gewachsen sind (Abb. 3.30, Abb. 3.31). Eine mögliche Erklärung für diese – wenn auch schwache – Bindung wäre die Tatsache, dass CREB auch an die CRE-Teilsequenz 5'-CGTCA-3' bindet (Mayr & Montminy, 2001). Forskolin bewirkt als Aktivator der Adenylatcyclase einen cAMP-Anstieg, eine Aktivierung der Proteinkinase A und demzufolge eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB, der wiederum erst im phosphorylierten Zustand die Expression seiner *Target*-Gene hochreguliert (Yamamoto *et al.*, 1988). In PC-12-Zellen bindet CREB zwar an den *DYRK1A*-Promotor A (Abb. 3.30), aktiviert ihn aber nach cAMP-Stimulus (Forskolin) nicht (Abb. 3.32). Auch in PC-3- und SAOS-2-Zellen (s. S. 102) ist nur das Luciferasegen unter der CRE-Kontrolle cAMP-responsiv. Möglicherweise stimuliert CREB in den untersuchten Zelllinien infolge eines Nicht-cAMP-Stimulus (z. B. Stress, Ca²⁺-Ionen, Mitogene) die Aktivität von Promotor A zusammen mit weiteren Promotor-gebundenen Transkriptionsfaktoren, nicht jedoch mit CBP (Mayr & Montminy, 2001). Oder aber Forskolin-induziertes Phospho-CREB kann die ohnehin schon starke Aktivität des *DYRK1A*-Promotors A nicht weiter erhöhen, ähnlich wie bei dem in den meisten Zellen exprimierten *MAPK1*-Gen (Euskirchen *et al.*, 2004).

In JEG-3-Choriokarzinomzellen bewirkt eine T → A-Punktmutation der ersten Base im CRE (5'-TGACGTCA-3') eine über 90% geringere transkriptionelle Aktivität als mit der CRE-Konsensussequenz. Außerdem ist das Ausmaß der CRE-vermittelten transkriptionellen Aktivierung eines Gens stark von der das CRE umgebenden Nukleotidsequenz abhängig (Deutsch *et al.*, 1988). Die in drei unterschiedlichen Zelllinien fehlende cAMP-Antwort des *DYRK1A*-Promotors A könnte sich auch damit erklären lassen, dass die erste Base seines CRE-Motivs 5'-GGACGTCA-3' nicht mit der CREB-Konsensussequenz übereinstimmt und die angrenzenden Nukleotide eine Transaktivierung durch Phospho-CREB nicht begünstigen.

Interessanterweise besitzen 85% der Gene, an die CREB bindet, keine TATA-Box. Eine zum CRE proximale TATA-Box ist notwendig für die Rekrutierung des Koaktiva-

tors TBP (*TATA Box Binding Protein*) für die cAMP-induzierte transkriptionelle Aktivierung von CRE-haltigen Genen durch CREB (Conkright *et al.*, 2003). *DYRK1A*-Promotor A besitzt keine typische TATA-Box (s. S. 119) *upstream* von der CRE-ähnlichen CREB-Bindungsstelle (Abb. 3.1) und ist möglicherweise deshalb in Reporter-Gen-Assays nicht cAMP-responsiv.

4.2.4 Erhöhte *DYRK1A*-Expression bei Entzug von Serum

Der nach dreitägigem Entzug von Serum in NIH-3T3-Fibroblasten beobachtete Anstieg der *DYRK1A*-Proteinmenge (Abb. 3.42 A) lässt sich möglicherweise mit einer erhöhten Transkriptionsrate des *DYRK1A*-Gens erklären. Durch den Serumentzug werden die Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Erhalten die Zellen jedoch erneut Normalmedium (serumhaltig), durchlaufen sie zunächst weiterhin den Zellzyklus, bis auch sie – durch Konfluenz-bedingte Kontaktinhibition – in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus arretiert werden (Deng *et al.*, 2004).

In den humanen SAOS-2-Zellen weisen die beiden *DYRK1A*-Promotoren A und B bereits nach 17 h ohne Wachstumsfaktoren deutlich höhere Aktivitäten auf als in SAOS-2-Zellen, die in Normalmedium kultiviert werden (Abb. 3.6). Interessanterweise variiert der Effekt des kompletten bzw. partiellen Serumentzuges auf die Aktivität von *DYRK1A*-Promotor B von Zelllinie zu Zelllinie und in Abhängigkeit von seiner Dauer. So steigert beispielsweise ein eintägiger Serumentzug die Aktivität von Promotor B in SAOS-2-Zellen ca. 4,5-fach, in PC-3-Zellen dagegen nur ca. 1,5-fach (Abb. 3.7 A und B).

Möglicherweise werden bestimmte *DYRK1A*-bindende Transkriptionsfaktoren bei Serumentzug verstärkt exprimiert (Gos *et al.*, 2005) bzw. binden eher als unter normalen Wachstumsbedingungen an *DYRK1A*-Promotor A bzw. B. Oder aber im Serum enthaltene (Wachstums-)Faktoren aktivieren einen MAPK-Signalweg, über den beispielsweise ein Protein inhibiert wird, das an eine oder beide mutmaßlichen E-Boxen in *DYRK1A*-Promotor A (Abb. 3.1) bindet (Konsensussequenz CANNTG, N: beliebige Base) (Elnitski *et al.*, 1997) und dadurch dessen Aktivität stimuliert. So reprimieren z. B. die MAPK-aktivierten Proteinkinasen 3pK und MK2 die Aktivität des E-Box-bindenden, beispielsweise für die Zelldifferenzierung bedeutsamen Transkrip-

tionsfaktors E47 und damit die E47-abhängige (gewebsspezifische) Genexpression (Neufeld *et al.*, 2000).

Die Hochregulation von DYRK1A auf transkriptioneller und translationaler Ebene bei Serumentzug – in Analogie zu DYRK1B, die auf Transkriptionsebene durch RhoA und Cdc42 in der G₀-Phase aktiviert und durch mitogene Aktivierung des MEK-ERK-Signalweges in anderen Phasen des Zellzyklus herunterreguliert wird (Deng *et al.*, 2003) – deutet darauf hin, dass DYRK1A auch für die G₀-Phase des Zellzyklus von Bedeutung ist.

4.3 Stabilität der *DYRK1A*-mRNA

Neben der Transkription spielt die posttranskriptionelle Regulation, d. h. die mRNA-Stabilität, eine wesentliche Rolle bei der Genexpression in Säugetieren. Viele Zytokine, Wachstumsfaktoren, Onkogene und Zellzyklusregulatoren und damit die Prozesse, die sie vermitteln, werden schnell und kontextspezifisch über die Stabilität ihrer mRNA-Transkripte reguliert (Gingerich *et al.*, 2004). Eine geringe mRNA-Stabilität (Halbwertszeit ≤ 2 h) beeinflusst die Transkriptmenge nach transkriptioneller Induktion oder Repression stärker als eine hohe mRNA-Stabilität (Ross, 1995). AU-reiche Elemente (AREs) in der 3'-UTR instabiler Säugetier-mRNAs vermitteln deren raschen Abbau, beispielsweise eine mRNA-Deadenylierung durch Bindung sequenzspezifischer, destabilisierender Proteine (Chen & Shyu, 1995; Caballero *et al.*, 2004). Die sieben AU-reichen Elemente mit der Sequenz 5'-AUUUA-3' in der 3'-UTR der *DYRK1A*-mRNA, von denen vier im Menschen und in der Maus konserviert sind, legen einen schnellen Abbau der *DYRK1A*-mRNA nahe (Abb. 3.34).

Sowohl die humane *DYRK1A*-mRNA (PC-3-Zellen) als auch die murine *Dyrk1a*-mRNA (NIH-3T3-Zellen) sind mit Halbwertszeiten von ca. 120 min bzw. 240 min (*Northern blots* nach Aktinomycin D-Behandlung; Abb. 3.35 bis Abb. 3.37) im Vergleich zur *GAPDH*-mRNA mit einer Halbwertszeit von ca. 8 h (Dani *et al.*, 1984) instabil (kurzlebig). Sie sind allerdings stabiler als beispielsweise Histon-mRNA, deren *Turnover* nur 40 min während der S-Phase bzw. 10 min am Ende der S-Phase beträgt (Ross, 1995). Auch die COX-2-mRNA, die ein konserviertes ARE in der

3'-UTR enthält, ist mit einer Halbwertszeit von 30 min kurzlebiger als die *DYRK1A*-mRNA (Dixon *et al.*, 2000).

In PC-3-Zellen überexprimierte *GFP-DYRK1A*-mRNA, der die sieben AU-reichen Sequenzelemente der 3'-UTR fehlen, ist dagegen ähnlich stabil wie die mRNA des *Housekeeping*-Gens *GAPDH*, d. h. sie wird deutlich langsamer abgebaut als die endogene *DYRK1A*-mRNA (Abb. 3.36). Dies lässt vermuten, dass die AU-reichen Sequenzmotive in der 3'-UTR der *DYRK1A*-mRNA deren relativ schnellen Abbau vermitteln und somit *DYRK1A*-Menge und -Funktion beeinflussen.

In dieser Arbeit werden erstmalig die *DYRK1A*-Promotorregion sowie die Regulation der *DYRK1A*-Expression charakterisiert. Vermutlich vermitteln AU-reiche Elemente in der 3'-UTR die relativ geringe Stabilität der *DYRK1A*-mRNA, d. h. eine schnelle Regulation von *DYRK1A* auf posttranskriptioneller Ebene.

4.4 Charakterisierung von *DYRK1B*-Spleißvarianten

4.4.1 Expressionsmuster von *DYRK1B*-p65, -p69 und -p75

Es existieren mindestens drei Spleißvarianten der Proteinkinase *DYRK1B*: durch alternatives Spleißen in Exon 9 ist *DYRK1B*-p69 vierzig Aminosäuren länger als *DYRK1B*-p65; die Expression von *DYRK1B*-p65/-p69 bzw. *DYRK1B*-p75 wird durch zwei alternative Promotoren *upstream* von Exon 1A bzw. Exon 1B gesteuert, wobei ein neuer Translationsstart in Exon 1B generiert wird, sodass *DYRK1B*-p75 sechzig Aminosäuren länger als *DYRK1B*-p69 ist (Leder *et al.*, 2003) (Abb. 2.1 bis 2.3).

Die drei erstmals von Leder und Kollegen (2003) in höheren Eukaryoten nachgewiesenen Spleißvarianten *DYRK1B*-p65, -p69 und -p75 weisen unterschiedliche Expressionsmuster auf: während die katalytisch aktive *DYRK1B*-p69 in den meisten untersuchten Geweben identifiziert wurde, wurde die ebenfalls funktionelle *DYRK1B*-p75 speziell im Skelettmuskel und die katalytisch inaktive *DYRK1B*-p65 nur in einigen der untersuchten Mausgewebe nachgewiesen, beispielsweise im Hoden. Die mit 75 kDa größte *DYRK1B*-Spleißvariante wird auch in GT1-7-Zellen (neuronale Hypothalamus-Zelllinie der Maus) und in der differenzierten, Adipozyten-ähnlichen

Fibroblasten-Zelllinie 3T3-L1 (Maus) exprimiert (Leder *et al.*, 2003). Das Expressionsmuster dieser Spleißvarianten ist jedoch noch unzureichend bekannt.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass DYRK1B-p75 auch in den Nagetier-Insulinoma-Zelllinien HIT-T15 (Hamster), INS-1 (Ratte) und RINm5F (Ratte) exprimiert wird (Abb. 3.38 A). Welche Funktion(en) DYRK1B-p75 in Insulinomazellen, Adipozyten, neuronalen bzw. muskulären Zellen ausübt, und ob sie auch in normalen pankreatischen Betazellen exprimiert wird, muss noch erforscht werden. PC-3-Zellen (humanes Prostataadenokarzinom; Abb. 3.16 A, Abb. 3.38 B) exprimieren nur die katalytisch aktive DYRK1B-p69 und die katalytisch inaktive DYRK1B-p65. Möglicherweise inhibiert die inaktive Spleißvariante DYRK1B-p65 kompetitiv Substrat-Interaktionen von DYRK1B-p69 bzw. DYRK1B-p75.

4.4.2 Funktionelle Charakterisierung dieser drei DYRK1B-Spleißvarianten

Die Proteinkinasen DYRK1A und DYRK1B interagieren mit dem Transkriptionsfaktor FKHR (*Forkhead in Rhabdomyosarcoma*) (Woods *et al.*, 2001b; von Groote-Bidlingmaier *et al.*, 2003), einem negativen Regulator der Insulinsensitivität in Leber, Adipozyten und pankreatischen Betazellen (Nakae *et al.*, 2002). DYRK1A und DYRK1B stimulieren die FKHR-abhängige Aktivität des Glukose-6-Phosphatase-Promotors (von Groote-Bidlingmaier *et al.*, 2003).

Um die Einflüsse der DYRK1B-Spleißvarianten auf die Aktivität des Glukose-6-Phosphatase-Promotors zu vergleichen, wurden die cDNAs der Kinase-aktiven DYRK1B-p69 bzw. -p75 bzw. der katalytisch inaktiven DYRK1B-p65 und von FKHR in COS-7-Zellen kotransfiziert. Alle drei Spleißvarianten stimulieren dosisabhängig die FKHR-abhängige Aktivität des Glukose-6-Phosphatase-Promotors, DYRK1B-p65 allerdings nur max. ca. 1,5-fach (Abb. 3.39) (Leder *et al.*, 2003). Der stimulierende Effekt der Kinase-inaktiven DYRK1B-p65 lässt sich möglicherweise mit einer Interaktion von DYRK1B-p65 und FKHR erklären, in die die katalytische Domäne nicht involviert ist und die eine Konformationsänderung von FKHR bewirkt, die für dessen transkriptionelle Aktivität erforderlich ist. Auch Kinase-inaktive DYRK1A stimuliert synergistisch mit FKHR die Aktivität des Glukose-6-Phosphatase-Promotors (von Groote-Bidlingmaier *et al.*, 2003). Die Aktivierung (Phosphorylierung) von CREB durch

Kinase-aktive und Kinase-inaktive DYRK3 wird dagegen möglicherweise durch eine Inter-aktion von DYRK3 mit PKA (Proteinkinase A) vermittelt (Li *et al.*, 2002).

Die im Vergleich zu DYRK1B-p65 stärkere Stimulation der Glukose-6-Phosphatase-Promotoraktivität durch DYRK1B-p69 bzw. DYRK1B-p75 in Synergie mit FKHR deutet auf funktionelle Unterschiede zwischen diesen Spleißvarianten hin, die über die Kinaseaktivität hinausgehen.

Zahlreiche humane Tumorzelllinien (z. B. Kolonkarzinomzellen, duktales Adenokarzinomzellen des Pankreas, Rhabdomyosarkomzellen) exprimieren viel DYRK1B, die dort auch als „*survival kinase*“ bezeichnet wird (Lee *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2006; Mercer *et al.*, 2006). Kolonkarzinomzellen, die die katalytisch aktive DYRK1B stabil überexprimieren, weisen während eines mehrtägigen Entzugs von Serum (Wachstumsfaktoren) eine höhere Überlebensrate (bzw. Zellproliferation; MTT-Assay) als die untransfizierten Zellen auf. Eine mit dem Serumentzug in der Zellkultur vergleichbare Situation tritt beispielsweise im frühen Stadium von Kolonkrebs auf, wenn MAP-Kinasen aufgrund suboptimaler Vaskularisierung nicht stark durch extrazelluläre Signale aktiviert werden (Lee *et al.*, 2000).

Dies trifft jedoch nicht auf NIH-3T3-Fibroblasten zu: im Gegensatz zu U9- und HD3-Kolonkarzinomzellen (Lee *et al.*, 2000) verbessert überexprimierte im Vergleich zu endogener DYRK1B-p69 nicht die Lebensfähigkeit serumfrei wachsender NIH-3T3-Zellen (s. S. 114 - 115; WST-Assay). Ob der Serumentzug die NIH-3T3-Zellen wirklich in der G₀/G₁-Phase arretierte, wurde nicht untersucht, wird aber von Deng und Kollegen (2004) beschrieben. Auch unter normalen Wachstumsbedingungen, d. h. wenn die NIH-3T3-Zellen mit Serum versorgt werden und den Zellzyklus normal durchlaufen, erhöht überexprimierte DYRK1B-p69 in Relation zu endogener DYRK1B-p69 die Überlebens-/Proliferationsrate nicht (Abb. 3.43 A).

DYRK1B wird mit Wachstumsstopp bzw. Differenzierung dieser Zelllinie und der murinen Myoblasten-Zelllinie C2C12 assoziiert, da DYRK1B in der G₀-Phase am stärksten exprimiert wird und durch Phosphorylierung sowohl Cyclin D1 destabilisiert (Zou *et al.*, 2004) als auch in der G₀-Phase den CDK-Inhibitor p27 stabilisiert (Deng *et al.*, 2004). Wird die DYRK1B-Expression durch RNA-Interferenz unterdrückt, treten in der G₀-Phase arretierte NIH-3T3-Zellen wieder in den Zellzyklus ein (Deng *et al.*, 2004).

4.4.3 Regulation von DYRK1B in NIH-3T3-Zellen

Der Entzug von Wachstumsfaktoren arretiert den Zellzyklus der Kolonkarzinom-Zelllinie U9 in der G₀/G₁-Phase und senkt die ERK1/2-Aktivität, wohingegen der endogene DYRK1B-Gehalt der Zellen hochreguliert wird (Lee *et al.*, 2000). In murinen Myoblasten wird die Expression der „G₀ checkpoint kinase“ DYRK1B, die von Lee und Kollegen (2000) als „Mirk“ bezeichnet wird, in der G₀-Phase des Zellzyklus transkriptionell hochreguliert (Deng *et al.*, 2003).

Um zu untersuchen, ob die DYRK1B-Expression während der G₀-Phase des Zellzyklus auch in Fibroblasten transkriptionell reguliert wird, werden murine NIH-3T3-Zellen mit Hilfe von Retroviren mit der cDNA für DYRK1B-p69 bzw. -p65 stabil transfiziert und mit untransfizierten NIH-3T3-Zellen in ihrer DYRK1B-p69-Expression bei Serumentzug (G₀-Phasen-Arrest) verglichen.

Durch Serumentzug werden die ohnehin schon fast konfluenten Zellen in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Die Zellen, die wieder mit frischem Normalmedium versorgt werden, durchlaufen zunächst weiterhin den Zellzyklus, bis auch sie konfluent sind und in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus arretiert werden (Deng *et al.*, 2004). Dies erklärt wohl, warum die serumfrei gesetzten NIH-3T3-Zellen etwa gleich viel DYRK1A bzw. DYRK1B-p69 exprimieren wie fast konfluente NIH-3T3-Zellen, die weiterhin mit Serum versorgt werden. Im Verlauf des dreitägigen Serumentzugs nimmt die endogene DYRK1B-p65/p69-Expression deutlich zu (Abb. 3.42 B). Die Expression exogener DYRK1B-p65 und -p69 (s. S. 112 - 113) in fast konfluent gewachsenen NIH-3T3-Zellen ändert sich hingegen unter Serumentzug nicht wesentlich. Sie wird durch den retroviralen Promotor im pWZL-neo-Plasmid kontrolliert, wohingegen die endogene DYRK1B-p65/-p69-Expression durch den endogenen Promotor reguliert wird. Dies lässt vermuten, dass die Hochregulation der DYRK1B-Proteinmenge in der G₀-Phase des Zellzyklus von NIH-3T3-Zellen – in Analogie zur murinen Myoblasten-Zelllinie C2C12 – nicht auf translationaler Ebene, sondern transkriptionell, d. h. über die Stimulation ihrer Promotoraktivität, reguliert wird.

5. Zusammenfassung

Der in Eukaryoten evolutionär konservierten und in Säugetieren ubiquitär exprimierten Proteinkinase DYRK1A (*Dual-Specificity Tyrosine (Y) Phosphorylation-Regulated Kinase 1A*) wird eine essentielle Bedeutung für Zellwachstum und -entwicklung zugeschrieben. Das menschliche *DYRK1A*-Gen ist in der „Down Syndrome Critical Region“ auf Chromosom 21 (21q22.13) lokalisiert. Es wird vermutet, dass bereits die 1,5-fache Überexpression dieses Gens zum Down-Syndrom beiträgt. Da DYRK1A schon während ihrer Biosynthese an einem Tyrosinrest in der Aktivierungsschleife autophosphoryliert und daher möglicherweise konstitutiv aktiv ist, könnten Synthese und Abbau der *DYRK1A*-mRNA ihre Funktion beeinflussen.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die Charakterisierung der humanen *DYRK1A*-Promotoren und die Regulation der *DYRK1A*-Expression.

In der 5'-Region des menschlichen *DYRK1A*-Gens wurden durch *in silico*-Analyse und durch eine Serie von Reporter-Gen-Experimenten in drei Säugetier-Zelllinien zwei alternative Transkriptionsstarts und die zugehörigen Promotorbereiche identifiziert. Die Promotoren A und B sind nicht gewebsspezifisch aktiv, unterscheiden sich jedoch in ihrer Aktivität und Regulation: Promotor A war 3- bis 14-fach aktiver als Promotor B.

Der überexprimierte Transkriptionsfaktor E2F1 regulierte z. B. in SAOS-2-Zellen (humane Osteosarkom-Zelllinie) im *Northern blot* die *DYRK1A*-Expression ca. 1,6-fach hoch und stimulierte im Reporter-Gen-Assay selektiv die Aktivität von Promotor B ca. 2,5-fach. E2F1 stimuliert während der G₁/S-Phase des Zellzyklus die Expression von Genen, die für die Zellzykluskontrolle von Bedeutung sind, und kann bei einer DNA-Schädigung Apoptose auslösen.

In cDNA-Arrays wurde weder in Tumorzellen im Vergleich zu gesundem Gewebe, noch in 26 Tumorzelllinien eine systematisch veränderte *DYRK1A*-Expression nachgewiesen. 5-Fluorouracil (5-FU), das den Zellzyklus in der S-Phase anhielt, regulierte das in PC-3-Zellen (humane Prostataadenokarzinom-Zelllinie) bereits basal stark exprimierte *DYRK1A*-Gen im cDNA-Array hoch. Die beispielsweise in PC-3-Zellen im *Northern blot* nachgewiesene zeit- und dosisabhängige Hochregulation der *DYRK1A*-Expression durch 5-FU wurde nicht auf Promotorebene vermittelt.

An das in *DYRK1A*-Promotor A lokalisierte CRE (*cyclic AMP Response Element*)-Motiv band der u. a. für die neuronale Entwicklung bedeutsame Transkriptionsfaktor CREB in PC-12-Zellen (Phäochromozytom-Zelllinie der Ratte) zwar schwach, aber spezifisch (EMSA). Nach Forskolin-induzierter Aktivierung der Adenylatcyclase aktivierte CREB Promotor A jedoch nicht, auch nicht in PC-3- und SAOS-2-Zellen.

Serumentzug aktivierte in SAOS-2-Zellen Promotor A ca. 1,7-fach, Promotor B ca. 3-fach. Auch die im *Western blot* nachweisbare Zunahme der *DYRK1A*-Expression in NIH-3T3-Fibroblasten bei dreitägigem Entzug von Serum deutet darauf hin, dass *DYRK1A* auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren reguliert wird.

Mit Hilfe des Transkriptionsinhibitors Aktinomycin D wurde in PC-3-Zellen im *Northern blot* eine Halbwertszeit der *DYRK1A*-mRNA von nur ca. zwei Stunden ermittelt. Fehlte die ca. 2,3 Kilobasen umfassende 3'-Region der *DYRK1A*-mRNA, die sieben 5'-AUUUA-3'-Motive für schnellen Abbau der mRNA enthält, war die *DYRK1A*-mRNA länger als vier Stunden stabil.

Die in Hoden und Skelettmuskel von Säugetieren stark exprimierte, mit *DYRK1A* eng verwandte Proteinkinase *DYRK1B* wird mit der Differenzierung (G₀-Phase des Zellzyklus) von Myoblasten und dem Überleben von Tumorzelllinien assoziiert.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich die in höheren Eukaryoten Kinase-aktiven Spleißvarianten *DYRK1B*-p69 und -p75 von der Kinase-inaktiven Spleißvariante *DYRK1B*-p65 über die Kinase-Aktivität hinaus funktionell unterscheiden: die menschlichen Spleißvarianten *DYRK1B*-p69 und -p75 stimulierten in COS-Zellen (Niere der Afrikanischen Grünen Meerkatze) im Reportergen-Assay die vom Transkriptionsfaktor FKHR (*Forkhead in Rhabdomyosarcoma*) abhängige Aktivität des Glukose-6-Phosphatase-Promotors stärker als die menschliche *DYRK1B*-p65.

Stabil überexprimierte *DYRK1B*-p69 erhöhte im Vergleich zur endogenen *DYRK1B* weder unter serumhaltigen noch unter serumfreien Wachstumsbedingungen die Überlebensrate von NIH-3T3-Fibroblasten (WST-„Viabilitäts“-Assay).

Diese Arbeit charakterisiert erstmalig die Promotorregion des humanen *DYRK1A*-Gens und die Regulation der *DYRK1A*-Expression im Zellzyklus. Zudem werden Expression und Funktion von drei Spleißvarianten der Proteinkinase *DYRK1B* (p65, p69 und p75) näher untersucht.

6. Literatur

- Altafaj, X., Dierssen, M., Baamonde, C., Marti, E., Visa, J., Guimera, J., Oset, M., Gonzalez, J. R., Florez, J., Fillat, C. & Estivill, X. (2001). Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum.Mol.Genet.*, 10, 1915-1923.
- Álvarez, M., Estivill, X. & de la Luna, S. (2003). DYRK1A accumulates in splicing speckles through a novel targeting signal and induces speckle disassembly. *J.Cell Sci.*, 116, 3099-3107.
- Araki, E., Shimada, F., Uzawa, H., Mori, M. & Ebina, Y. (1987). Characterization of the promoter region of the human insulin receptor gene. Evidence for promoter activity. *J.Biol.Chem.*, 262, 16186-16191.
- Arron, J. R., Winslow, M. M., Polleri, A., Chang, C. P., Wu, H., Gao, X., Neilson, J. R., Chen, L., Heit, J. J., Kim, S. K., Yamasaki, N., Miyakawa, T., Francke, U., Graef, I. A. & Crabtree, G. R. (2006). NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature*, 441, 595-600.
- Azzi, A., Boscoboinik, D. & Hensey, C. (1992). The protein kinase C family. *Eur.J.Biochem.*, 208, 547-557.
- Bähler, J. & Pringle, J. R. (1998). Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes Dev.*, 12, 1356-1370.
- Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M. & Cohen, P. (2003). The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem.J.*, 371, 199-204.
- Bates, S., Phillips, A. C., Clark, P. A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R. L. & Vousden, K. H. (1998). p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature*, 395, 124-125.
- Becker, W. & Joost, H. G. (1999). Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.*, 62, 1-17.
- Becker, W., Weber, Y., Wetzels, K., Eirnbter, K., Tejedor, F. J. & Joost, H. G. (1998). Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of

- DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J.Biol.Chem.*, 273, 25893-25902.
- Benavides-Piccione, R., Dierssen, M., Ballesteros-Yanez, I., Martinez de Lagran, M., Arbones, M. L., Fotaki, V., DeFelipe, J. & Elston, G. N. (2005). Alterations in the phenotype of neocortical pyramidal cells in the Dyrk1A^{+/-} mouse. *Neurobiol.Dis.*, 20, 115-122.
- Benoist, C., O'Hare, K., Breathnach, R. & Chambon, P. (1980). The ovalbumin gene-sequence of putative control regions. *Nucleic Acids Res.*, 8, 127-142.
- Bird, A. P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321, 209-213.
- Blais, A. & Dynlacht, B. D. (2004). Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 14, 527-532.
- Boyer, J., McLean, E. G., Aroori, S., Wilson, P., McCulla, A., Carey, P. D., Longley, D. B. & Johnston, P. G. (2004). Characterization of p53 wild-type and null isogenic colorectal cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil, oxaliplatin, and irinotecan. *Clin.Cancer Res.*, 10, 2158-2167.
- Branchi, I., Bichler, Z., Minghetti, L., Delabar, J. M., Malchiodi-Albedi, F., Gonzalez, M. C., Chettouh, Z., Nicolini, A., Chabert, C., Smith, D. J., Rubin, E. M., Migliore-Samour, D. & Alleva, E. (2004). Transgenic mouse in vivo library of human Down syndrome critical region 1: association between DYRK1A overexpression, brain development abnormalities, and cell cycle protein alteration. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*, 63, 429-440.
- Breathnach, R. & Chambon, P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu.Rev.Biochem.*, 50, 349-383.
- Briggs, M. R., Kadonaga, J. T., Bell, S. P. & Tjian, R. (1986). Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science*, 234, 47-52.
- Bronstein, I., Edwards, B. & Voyta, J. C. (1989). 1,2-dioxetanes: novel chemiluminescent enzyme substrates. Applications to immunoassays. *J.Biolumin.Chemilumin.*, 4, 99-111.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, 282, 1497-1501.

- Caballero, J. J., Giron, M. D., Vargas, A. M., Sevillano, N., Suarez, M. D. & Salto, R. (2004). AU-rich elements in the mRNA 3'-untranslated region of the rat receptor for advanced glycation end products and their relevance to mRNA stability. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 319, 247-255.
- Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M. C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., Kodzius, R., Shimokawa, K., Bajic, V. B., Brenner, S. E., Batalov, S., Forrest, A. R., Zavolan, M., Davis, M. J., Wilming, L. G., Aidinis, V., Allen, J. E., mbesi-Impiombato, A., Apweiler, R., Aturaliya, R. N., Bailey, T. L., Bansal, M., Baxter, L., Beisel, K. W., Bersano, T., Bono, H., Chalk, A. M., Chiu, K. P., Choudhary, V., Christoffels, A., Clutterbuck, D. R., Crowe, M. L., Dalla, E., Dalrymple, B. P., de, B. B., Della, G. G., di, B. D., Down, T., Engstrom, P., Fagiolini, M., Faulkner, G., Fletcher, C. F., Fukushima, T., Furuno, M., Futaki, S., Gariboldi, M., Georgii-Hemming, P., Gingeras, T. R., Gojobori, T., Green, R. E., Gustincich, S., Harbers, M., Hayashi, Y., Hensch, T. K., Hirokawa, N., Hill, D., Huminiecki, L., Iacono, M., Ikeo, K., Iwama, A., Ishikawa, T., Jakt, M., Kanapin, A., Katoh, M., Kawasaki, Y., Kelso, J., Kitamura, H., Kitano, H., Kollias, G., Krishnan, S. P., Kruger, A., Kummerfeld, S. K., Kurochkin, I. V., Lareau, L. F., Lazarevic, D., Lipovich, L., Liu, J., Liuni, S., McWilliam, S., Madan, B. M., Madera, M., Marchionni, L., Matsuda, H., Matsuzawa, S., Miki, H., Mignone, F., Miyake, S., Morris, K., Mottagui-Tabar, S., Mulder, N., Nakano, N., Nakauchi, H., Ng, P., Nilsson, R., Nishiguchi, S., Nishikawa, S., Nori, F., Ohara, O., Okazaki, Y., Orlando, V., Pang, K. C., Pavan, W. J., Pavesi, G., Pesole, G., Petrovsky, N., Piazza, S., Reed, J., Reid, J. F., Ring, B. Z., Ringwald, M., Rost, B., Ruan, Y., Salzberg, S. L., Sandelin, A., Schneider, C., Schonbach, C., Sekiguchi, K., Semple, C. A., Seno, S., Sessa, L., Sheng, Y., Shibata, Y., Shimada, H., Shimada, K., Silva, D., Sinclair, B., Sperling, S., Stupka, E., Sugiura, K., Sultana, R., Takenaka, Y., Taki, K., Tammaja, K., Tan, S. L., Tang, S., Taylor, M. S., Tegner, J., Teichmann, S. A., Ueda, H. R., van, N. E., Verardo, R., Wei, C. L., Yagi, K., Yamanishi, H., Zabarovsky, E., Zhu, S., Zimmer, A., Hide, W., Bult, C., Grimmond, S. M., Teasdale, R. D., Liu, E. T., Brusic, V., Quackenbush, J., Wahlestedt, C., Mattick, J. S., Hume, D. A., Kai, C., Sasaki, D., Tomaru, Y., Fukuda, S., Kanamori-Katayama, M., Suzuki, M., Aoki, J., Arakawa, T., Iida, J., Imamura, K., Itoh, M., Kato, T., Kawaji, H., Kawagashira, N., Kawashima, T., Kojima, M., Kondo, S., Konno, H., Nakano, K., Ninomiya, N., Nishio, T., Okada, M., Plessy, C., Shibata, K., Shiraki, T., Suzuki, S., Tagami, M., Waki, K., Watahiki, A., Okamura-Oho, Y., Suzuki, H., Kawai, J. & Hayashizaki, Y. (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*, 309, 1559-1563.
- Carninci, P., Sandelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., Ponjavic, J., Semple, C. A., Taylor, M. S., Engstrom, P. G., Frith, M. C., Forrest, A. R., Alkema, W. B., Tan, S. L., Plessy, C., Kodzius, R., Ravasi, T., Kasukawa, T., Fukuda, S., Kanamori-Katayama, M., Kitazume, Y., Kawaji, H., Kai, C., Nakamura, M., Konno, H., Nakano, K., Mottagui-Tabar, S., Arner, P., Chesi, A., Gustincich, S., Persichetti, F., Suzuki, H., Grimmond, S. M., Wells, C. A., Orlando, V., Wahlestedt, C., Liu, E. T., Harbers, M., Kawai, J., Bajic, V. B.,

- Hume, D. A. & Hayashizaki, Y. (2006). Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat.Genet.*, 38, 626-635.
- Cha-Molstad, H., Keller, D. M., Yochum, G. S., Impey, S. & Goodman, R. H. (2004). Cell-type-specific binding of the transcription factor CREB to the cAMP-response element. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 101, 13572-13577.
- Chen, C. Y. & Shyu, A. B. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem.Sci.*, 20, 465-470.
- Chen, H. & Antonarakis, S. E. (1997). Localisation of a human homologue of the *Drosophila* *mnf* and rat *Dyrk* genes to chromosome 21q22.2. *Hum.Genet.*, 99, 262-265.
- Cohen, P. (1992). Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends Biochem.Sci.*, 17, 408-413.
- Cohen, P. (2002). Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat.Rev.Drug Discov.*, 1, 309-315.
- Cole, A., Frame, S. & Cohen, P. (2004). Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event
132. *Biochem.J.*, 377, 249-255.
- Colton, T. (1974). *Statistics in Medicine*. Little, Brown & Co., Boston.
- Conkright, M. D., Guzman, E., Flechner, L., Su, A. I., Hogenesch, J. B. & Montminy, M. (2003). Genome-wide analysis of CREB target genes reveals a core promoter requirement for cAMP responsiveness. *Mol.Cell*, 11, 1101-1108.
- Conkright, M. D. & Montminy, M. (2005). CREB: the unindicted cancer co-conspirator. *Trends Cell Biol.*, 15, 457-459.
- Dani, C., Piechaczyk, M., Audigier, Y., El, S. S., Cathala, G., Marty, L., Fort, P., Blanchard, J. M. & Jeanteur, P. (1984). Characterization of the transcription products of glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase gene in HeLa cells. *Eur.J.Biochem.*, 145, 299-304.
- de Graaf, K., Czajkowska, H., Rottmann, S., Packman, L. C., Lilischkis, R., Luscher, B. & Becker, W. (2006). The protein kinase DYRK1A phosphorylates the

- splicing factor SF3b1/SAP155 at Thr434, a novel in vivo phosphorylation site. *BMC.Biochem.*, 7, 7.
- de Graaf, K., Hekerman, P., Spelten, O., Herrmann, A., Packman, L. C., Bussow, K., Muller-Newen, G. & Becker, W. (2004). Characterization of cyclin L2, a novel cyclin with an arginine/serine-rich domain: phosphorylation by DYRK1A and colocalization with splicing factors. *J.Biol.Chem.*, 279, 4612-4624.
- de Wit, N. J., Burtscher, H. J., Weidle, U. H., Ruiter, D. J. & van Muijen, G. N. (2002). Differentially expressed genes identified in human melanoma cell lines with different metastatic behaviour using high density oligonucleotide arrays. *Melanoma Res.*, 12, 57-69.
- Delabar, J. M., Theophile, D., Rahmani, Z., Chettouh, Z., Blouin, J. L., Prieur, M., Noel, B. & Sinet, P. M. (1993). Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur.J.Hum.Genet.*, 1, 114-124.
- Denchi, E. L. & Helin, K. (2005). E2F1 is crucial for E2F-dependent apoptosis. *EMBO Rep.*, 6, 661-668.
- Deng, X., Ewton, D. Z., Li, S., Naqvi, A., Mercer, S. E., Landas, S. & Friedman, E. (2006). The kinase Mirk/Dyrk1B mediates cell survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 66, 4149-4158.
- Deng, X., Ewton, D. Z., Mercer, S. E. & Friedman, E. (2005). Mirk/dyrk1B decreases the nuclear accumulation of class II histone deacetylases during skeletal muscle differentiation. *J.Biol.Chem.*, 280, 4894-4905.
- Deng, X., Ewton, D. Z., Pawlikowski, B., Maimone, M. & Friedman, E. (2003). Mirk/dyrk1B is a Rho-induced kinase active in skeletal muscle differentiation. *J.Biol.Chem.*, 278, 41347-41354.
- Deng, X., Mercer, S. E., Shah, S., Ewton, D. Z. & Friedman, E. (2004). The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is stabilized in G(0) by Mirk/dyrk1B kinase. *J.Biol.Chem.*, 279, 22498-22504.
- Deutsch, P. J., Hoeffler, J. P., Jameson, J. L., Lin, J. C. & Habener, J. F. (1988). Structural determinants for transcriptional activation by cAMP-responsive DNA elements. *J.Biol.Chem.*, 263, 18466-18472.
- Dixon, D. A., Kaplan, C. D., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A. & Prescott, S. M. (2000). Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region. *J.Biol.Chem.*, 275, 11750-11757.

- Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.*, 12, 2245-2262.
- Edelman, A. M., Blumenthal, D. K. & Krebs, E. G. (1987). Protein serine/threonine kinases. *Annu.Rev.Biochem.*, 56, 567-613.
- Efstratiadis, A., Posakony, J. W., Maniatis, T., Lawn, R. M., O'Connell, C., Spritz, R. A., DeRiel, J. K., Forget, B. G., Weissman, S. M., Slightom, J. L., Blechl, A. E., Smithies, O., Baralle, F. E., Shoulders, C. C. & Proudfoot, N. J. (1980). The structure and evolution of the human beta-globin gene family. *Cell*, 21, 653-668.
- Elnitski, L., Miller, W. & Hardison, R. (1997). Conserved E boxes function as part of the enhancer in hypersensitive site 2 of the beta-globin locus control region. Role of basic helix-loop-helix proteins. *J.Biol.Chem.*, 272, 369-378.
- Euskirchen, G., Royce, T. E., Bertone, P., Martone, R., Rinn, J. L., Nelson, F. K., Sayward, F., Luscombe, N. M., Miller, P., Gerstein, M., Weissman, S. & Snyder, M. (2004). CREB binds to multiple loci on human chromosome 22. *Mol.Cell Biol.*, 24, 3804-3814.
- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal.Biochem.*, 132, 6-13.
- Fotaki, V., Dierssen, M., Alcantara, S., Martinez, S., Marti, E., Casas, C., Visa, J., Soriano, E., Estivill, X. & Arbones, M. L. (2002). Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. *Mol.Cell Biol.*, 22, 6636-6647.
- Galceran, J., de, G. K., Tejedor, F. J. & Becker, W. (2003). The MNB/DYRK1A protein kinase: genetic and biochemical properties. *J.Neural Transm.Suppl*, 139-148.
- Gardiner-Garden, M. & Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J.Mol.Biol.*, 196, 261-282.
- Garrett, S. & Broach, J. (1989). Loss of Ras activity in *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by disruptions of a new kinase gene, YAK1, whose product may act downstream of the cAMP-dependent protein kinase. *Genes Dev.*, 3, 1336-1348.

- Garrett, S., Menold, M. M. & Broach, J. R. (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* YAK1 gene encodes a protein kinase that is induced by arrest early in the cell cycle. *Mol.Cell Biol.*, 11, 4045-4052.
- Geiger, J. N., Knudsen, G. T., Panek, L., Pandit, A. K., Yoder, M. D., Lord, K. A., Creasy, C. L., Burns, B. M., Gaines, P., Dillon, S. B. & Wojchowski, D. M. (2001). mDYRK3 kinase is expressed selectively in late erythroid progenitor cells and attenuates colony-forming unit-erythroid development. *Blood*, 97, 901-910.
- Gingerich, T. J., Feige, J. J. & LaMarre, J. (2004). AU-rich elements and the control of gene expression through regulated mRNA stability. *Anim Health Res.Rev.*, 5, 49-63.
- Gos, M., Miloszezewska, J., Swoboda, P., Trembacz, H., Skierski, J. & Janik, P. (2005). Cellular quiescence induced by contact inhibition or serum withdrawal in C3H10T1/2 cells
4. *Cell Prolif.*, 38, 107-116.
- Gossen, M. & Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters
35. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 89, 5547-5551.
- Graham, F. L. & van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 52, 456-467.
- Guimerà, J., Casas, C., Estivill, X. & Pritchard, M. (1999). Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome. *Genomics*, 57, 407-418.
- Guimerà, J., Casas, C., Pucharcos, C., Solans, A., Domenech, A., Planas, A. M., Ashley, J., Lovett, M., Estivill, X. & Pritchard, M. A. (1996). A human homologue of *Drosophila* minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Hum.Mol.Genet.*, 5, 1305-1310.
- Hämmerle, B., Carnicero, A., Elizalde, C., Ceron, J., Martinez, S. & Tejedor, F. J. (2003a). Expression patterns and subcellular localization of the Down syndrome candidate protein MNB/DYRK1A suggest a role in late neuronal differentiation. *Eur.J.Neurosci.*, 17, 2277-2286.

- Hämmerle, B., Elizalde, C., Galceran, J., Becker, W. & Tejedor, F. J. (2003b). The MNB/DYRK1A protein kinase: neurobiological functions and Down syndrome implications. *J.Neural Transm.Suppl*, 129-137.
- Hämmerle, B., Vera-Samper, E., Speicher, S., Arencibia, R., Martinez, S. & Tejedor, F. J. (2002). Mnb/Dyrk1A is transiently expressed and asymmetrically segregated in neural progenitor cells at the transition to neurogenic divisions. *Dev.Biol.*, 246, 259-273.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J.Mol.Biol.*, 166, 557-580.
- Hanks, S. K. & Quinn, A. M. (1991). Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol.*, 200, 38-62.
- Hansel, D. E., Rahman, A., House, M., Ashfaq, R., Berg, K., Yeo, C. J. & Maitra, A. (2004). Met proto-oncogene and insulin-like growth factor binding protein 3 overexpression correlates with metastatic ability in well-differentiated pancreatic endocrine neoplasms. *Clin.Cancer Res.*, 10, 6152-6158.
- Hassold, T. J. & Jacobs, P. A. (1984). Trisomy in man. *Annu.Rev.Genet.*, 18, 69-97.
- Hattori, M., Fujiyama, A., Taylor, T. D., Watanabe, H., Yada, T., Park, H. S., Toyoda, A., Ishii, K., Totoki, Y., Choi, D. K., Groner, Y., Soeda, E., Ohki, M., Takagi, T., Sakaki, Y., Taudien, S., Blechschmidt, K., Polley, A., Menzel, U., Delabar, J., Kumpf, K., Lehmann, R., Patterson, D., Reichwald, K., Rump, A., Schillhabel, M., Schudy, A., Zimmermann, W., Rosenthal, A., Kudoh, J., Schibuya, K., Kawasaki, K., Asakawa, S., Shintani, A., Sasaki, T., Nagamine, K., Mitsuyama, S., Antonarakis, S. E., Minoshima, S., Shimizu, N., Nordsiek, G., Hornischer, K., Brant, P., Scharfe, M., Schon, O., Desario, A., Reichelt, J., Kauer, G., Blocker, H., Ramser, J., Beck, A., Klages, S., Hennig, S., Riesselmann, L., Dagand, E., Haaf, T., Wehrmeyer, S., Borzym, K., Gardiner, K., Nizetic, D., Francis, F., Lehrach, H., Reinhardt, R. & Yaspo, M. L. (2000). The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*, 405, 311-319.
- Himpel, S., Panzer, P., Eirnbter, K., Czajkowska, H., Sayed, M., Packman, L. C., Blundell, T., Kentrup, H., Grotzinger, J., Joost, H. G. & Becker, W. (2001). Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A. *Biochem.J.*, 359, 497-505.
- Himpel, S., Tegge, W., Frank, R., Leder, S., Joost, H. G. & Becker, W. (2000). Specificity determinants of substrate recognition by the protein kinase DYRK1A. *J.Biol.Chem.*, 275, 2431-2438.

- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science*, 253, 49-53.
- Holmes, D. S. & Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal.Biochem.*, 114, 193-197.
- Impey, S., McCorkle, S. R., Cha-Molstad, H., Dwyer, J. M., Yochum, G. S., Boss, J. M., McWeeney, S., Dunn, J. J., Mandel, G. & Goodman, R. H. (2004). Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell*, 119, 1041-1054.
- Jin, K., Lim, S., Mercer, S. E. & Friedman, E. (2005). The survival kinase Mirk/dyrk1B is activated through Rac1-MKK3 signaling. *J.Biol.Chem.*, 280, 42097-42105.
- Kadonaga, J. T., Carner, K. R., Masiarz, F. R. & Tjian, R. (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell*, 51, 1079-1090.
- Kentrup, H., Becker, W., Heukelbach, J., Wilmes, A., Schurmann, A., Huppertz, C., Kainulainen, H. & Joost, H. G. (1996). Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *J.Biol.Chem.*, 271, 3488-3495.
- Kim, D., Won, J., Shin, D. W., Kang, J., Kim, Y. J., Choi, S. Y., Hwang, M. K., Jeong, B. W., Kim, G. S., Joe, C. O., Chung, S. H. & Song, W. J. (2004). Regulation of Dyrk1A kinase activity by 14-3-3. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 323, 499-504.
- Kim, N. D., Yoon, J., Kim, J. H., Lee, J. T., Chon, Y. S., Hwang, M. K., Ha, I. & Song, W. J. (2006). Putative therapeutic agents for the learning and memory deficits of people with Down syndrome. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, 16, 3772-3776.
- Kodzius, R., Kojima, M., Nishiyori, H., Nakamura, M., Fukuda, S., Tagami, M., Sasaki, D., Imamura, K., Kai, C., Harbers, M., Hayashizaki, Y. & Carninci, P. (2006). CAGE: cap analysis of gene expression. *Nat.Methods*, 3, 211-222.
- Krebs, E. G. & Beavo, J. A. (1979). Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu.Rev.Biochem.*, 48, 923-959.
- Leder, S. Die Proteinkinase DYRK1B: Klonierung, Charakterisierung und Herstellung einer DYRK1B-defizienten Maus (Dissertation). 2001.
Ref Type: Thesis/Dissertation

- Leder, S., Czajkowska, H., Maenz, B., de Graaf, K., Barthel, A., Joost, H. G. & Becker, W. (2003). Alternative splicing variants of dual specificity tyrosine phosphorylated and regulated kinase 1B exhibit distinct patterns of expression and functional properties. *Biochem.J.*, 372, 881-888.
- Leder, S., Weber, Y., Altafaj, X., Estivill, X., Joost, H. G. & Becker, W. (1999). Cloning and characterization of DYRK1B, a novel member of the DYRK family of protein kinases. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 254, 474-479.
- Lee, K., Deng, X. & Friedman, E. (2000). Mirk protein kinase is a mitogen-activated protein kinase substrate that mediates survival of colon cancer cells. *Cancer Res.*, 60, 3631-3637.
- Leimeister, C., Externbrink, A., Klamt, B. & Gessler, M. (1999). Hey genes: a novel subfamily of hairy- and Enhancer of split related genes specifically expressed during mouse embryogenesis. *Mech.Dev.*, 85, 173-177.
- Li, K., Zhao, S., Karur, V. & Wojchowski, D. M. (2002). DYRK3 activation, engagement of protein kinase A/cAMP response element-binding protein, and modulation of progenitor cell survival. *J.Biol.Chem.*, 277, 47052-47060.
- Lindberg, R. A., Quinn, A. M. & Hunter, T. (1992). Dual-specificity protein kinases: will any hydroxyl do? *Trends Biochem.Sci.*, 17, 114-119.
- Lochhead, P. A., Sibbet, G., Kinstrie, R., Cleghon, T., Rylatt, M., Morrison, D. K. & Cleghon, V. (2003). dDYRK2: a novel dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase in Drosophila. *Biochem.J.*, 374, 381-391.
- Lochhead, P. A., Sibbet, G., Morrice, N. & Cleghon, V. (2005). Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs. *Cell*, 121, 925-936.
- Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat.Rev.Cancer*, 3, 330-338.
- Lonze, B. E. & Ginty, D. D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*, 35, 605-623.
- Ma, Y., Croxton, R., Moorer, R. L., Jr. & Cress, W. D. (2002). Identification of novel E2F1-regulated genes by microarray. *Arch.Biochem.Biophys.*, 399, 212-224.

- Magnuson, M. A. & Shelton, K. D. (1989). An alternate promoter in the glucokinase gene is active in the pancreatic beta cell. *J.Biol.Chem.*, 264, 15936-15942.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298, 1912-1934.
- Martínez de Lagrán, M., Altafaj, X., Gallego, X., Marti, E., Estivill, X., Sahun, I., Fillat, C. & Dierssen, M. (2004). Motor phenotypic alterations in TgDyrk1a transgenic mice implicate DYRK1A in Down syndrome motor dysfunction. *Neurobiol.Dis.*, 15, 132-142.
- Matsumoto, N., Ohashi, H., Tsukahara, M., Kim, K. C., Soeda, E. & Niikawa, N. (1997). Possible narrowed assignment of the loci of monosomy 21-associated microcephaly and intrauterine growth retardation to a 1.2-Mb segment at 21q22.2. *Am.J.Hum.Genet.*, 60, 997-999.
- Mayr, B. & Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 2, 599-609.
- McCormick, M. K., Schinzel, A., Petersen, M. B., Stetten, G., Driscoll, D. J., Cantu, E. S., Tranebjaerg, L., Mikkelsen, M., Watkins, P. C. & Antonarakis, S. E. (1989). Molecular genetic approach to the characterization of the "Down syndrome region" of chromosome 21. *Genomics*, 5, 325-331.
- Mercer, S. E., Ewton, D. Z., Deng, X., Lim, S., Mazur, T. R. & Friedman, E. (2005). Mirk/Dyrk1B mediates survival during the differentiation of C2C12 myoblasts. *J.Biol.Chem.*, 280, 25788-25801.
- Mercer, S. E., Ewton, D. Z., Shah, S., Naqvi, A. & Friedman, E. (2006). Mirk/Dyrk1b mediates cell survival in rhabdomyosarcomas. *Cancer Res.*, 66, 5143-5150.
- Mercer, S. E. & Friedman, E. (2006). Mirk/Dyrk1B: a multifunctional dual-specificity kinase involved in growth arrest, differentiation, and cell survival. *Cell Biochem.Biophys.*, 45, 303-315.
- Montminy, M. R., Sevarino, K. A., Wagner, J. A., Mandel, G. & Goodman, R. H. (1986). Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 83, 6682-6686.
- Müller, H., Bracken, A. P., Vernell, R., Moroni, M. C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J. D. & Helin, K. (2001). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev.*, 15, 267-285.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, 51 Pt 1, 263-273.
- Nakae, J., Biggs, W. H., III, Kitamura, T., Cavenee, W. K., Wright, C. V., Arden, K. C. & Accili, D. (2002). Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. *Nat.Genet.*, 32, 245-253.
- Nelson, M. H. & Dolder, C. R. (2006). Lapatinib: a novel dual tyrosine kinase inhibitor with activity in solid tumors. *Ann.Pharmacother.*, 40, 261-269.
- Neufeld, B., Grosse-Wilde, A., Hoffmeyer, A., Jordan, B. W., Chen, P., Dinev, D., Ludwig, S. & Rapp, U. R. (2000). Serine/Threonine kinases 3pK and MAPK-activated protein kinase 2 interact with the basic helix-loop-helix transcription factor E47 and repress its transcriptional activity. *J.Biol.Chem.*, 275, 20239-20242.
- Neumann, B., Kubicka, P. & Barlow, D. P. (1995). Characteristics of imprinted genes. *Nat.Genet.*, 9, 12-13.
- Nigro, J. M., Baker, S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S. H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P. & . (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, 342, 705-708.
- O'Connor, D. J. & Lu, X. (2000). Stress signals induce transcriptionally inactive E2F-1 independently of p53 and Rb. *Oncogene*, 19, 2369-2376.
- Ohira, M., Seki, N., Nagase, T., Suzuki, E., Nomura, N., Ohara, O., Hattori, M., Sakaki, Y., Eki, T., Murakami, Y., Saito, T., Ichikawa, H. & Ohki, M. (1997). Gene identification in 1.6-Mb region of the Down syndrome region on chromosome 21. *Genome Res.*, 7, 47-58.
- Okui, M., Ide, T., Morita, K., Funakoshi, E., Ito, F., Ogita, K., Yoneda, Y., Kudoh, J. & Shimizu, N. (1999). High-level expression of the Mnb/Dyrk1A gene in brain and heart during rat early development. *Genomics*, 62, 165-171.
- Plaza, S., Dozier, C., Turque, N. & Saule, S. (1995). Quail Pax-6 (Pax-QNR) mRNAs are expressed from two promoters used differentially during retina development and neuronal differentiation. *Mol.Cell Biol.*, 15, 3344-3353.

- Plaza, S., Saule, S. & Dozier, C. (1999). High conservation of cis-regulatory elements between quail and human for the Pax-6 gene 39. *Dev. Genes Evol.*, 209, 165-173.
- Rahmani, Z., Blouin, J. L., Creau-Goldberg, N., Watkins, P. C., Mattei, J. F., Poissonnier, M., Prieur, M., Chettouh, Z., Nicole, A., Aurias, A. & . (1989). Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 5958-5962.
- Rogers, S., Wells, R. & Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, 234, 364-368.
- Roper, R. J. & Reeves, R. H. (2006). Understanding the basis for Down syndrome phenotypes. *PLoS. Genet.*, 2, e50.
- Ross, J. (1995). mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol. Rev.*, 59, 423-450.
- Sadowski, H. B. & Gilman, M. Z. (1993). Cell-free activation of a DNA-binding protein by epidermal growth factor. *Nature*, 362, 79-83.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*, 24, 104-108.
- Segar, R. & Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J.*, 9, 726-735.
- Shindoh, N., Kudoh, J., Maeda, H., Yamaki, A., Minoshima, S., Shimizu, Y. & Shimizu, N. (1996). Cloning of a human homolog of the Drosophila minibrain/rat Dyrk gene from "the Down syndrome critical region" of chromosome 21. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 225, 92-99.
- Simpson, E. R. (2004). Aromatase: biologic relevance of tissue-specific expression. *Semin. Reprod. Med.*, 22, 11-23.
- Sitz, J. H., Tigges, M., Baumgartel, K., Khaspekov, L. G. & Lutz, B. (2004). Dyrk1A potentiates steroid hormone-induced transcription via the chromatin remodeling factor Arip4. *Mol. Cell Biol.*, 24, 5821-5834.

- Smith, D. J., Stevens, M. E., Sudanagunta, S. P., Bronson, R. T., Makhinson, M., Watabe, A. M., O'Dell, T. J., Fung, J., Weier, H. U., Cheng, J. F. & Rubin, E. M. (1997). Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome. *Nat.Genet.*, 16, 28-36.
- Soderling, T. R. (1990). Protein kinases. Regulation by autoinhibitory domains 71. *J.Biol.Chem.*, 265, 1823-1826.
- Song, W. J., Sternberg, L. R., Kasten-Sportes, C., Keuren, M. L., Chung, S. H., Slack, A. C., Miller, D. E., Glover, T. W., Chiang, P. W., Lou, L. & Kurnit, D. M. (1996). Isolation of human and murine homologues of the *Drosophila* minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome "critical region". *Genomics*, 38, 331-339.
- Souza, G. M., Lu, S. & Kuspa, A. (1998). YakA, a protein kinase required for the transition from growth to development in *Dictyostelium*. *Development*, 125, 2291-2302.
- Stevens, C. & La Thangue, N. B. (2004). The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA Repair (Amst)*, 3, 1071-1079.
- Sutherland, C., Leighton, I. A. & Cohen, P. (1993). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem.J.*, 296 (Pt 1), 15-19.
- Taylor, S. S., Buechler, J. A. & Yonemoto, W. (1990). cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu.Rev.Biochem.*, 59, 971-1005.
- Tejedor, F., Zhu, X. R., Kaltenbach, E., Ackermann, A., Baumann, A., Canal, I., Heisenberg, M., Fischbach, K. F. & Pongs, O. (1995). minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron*, 14, 287-301.
- von Groote-Bidlingmaier, F., Schmoll, D., Orth, H. M., Joost, H. G., Becker, W. & Barthel, A. (2003). DYRK1 is a co-activator of FKHR (FOXO1a)-dependent glucose-6-phosphatase gene expression. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 300, 764-769.
- Wang, J., Kudoh, J., Shintani, A., Minoshima, S. & Shimizu, N. (1998). Identification of two novel 5' noncoding exons in human MNB/DYRK gene and alternatively spliced transcripts. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 250, 704-710.

- Wiechmann, S., Czajkowska, H., de Graaf, K., Grotzinger, J., Joost, H. G. & Becker, W. (2003). Unusual function of the activation loop in the protein kinase DYRK1A. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 302, 403-408.
- Wilson, T. & Treisman, R. (1988). Removal of poly(A) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by 3' AU-rich sequences. *Nature*, 336, 396-399.
- Woods, Y. L., Cohen, P., Becker, W., Jakes, R., Goedert, M., Wang, X. & Proud, C. G. (2001a). The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochem.J.*, 355, 609-615.
- Woods, Y. L., Rena, G., Morrice, N., Barthel, A., Becker, W., Guo, S., Unterman, T. G. & Cohen, P. (2001b). The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 in vitro, a novel in vivo phosphorylation site. *Biochem.J.*, 355, 597-607.
- Yamada, Y., Watanabe, H., Miura, F., Soejima, H., Uchiyama, M., Iwasaka, T., Mukai, T., Sakaki, Y. & Ito, T. (2004). A comprehensive analysis of allelic methylation status of CpG islands on human chromosome 21q. *Genome Res.*, 14, 247-266.
- Yamamoto, K. K., Gonzalez, G. A., Biggs, W. H., III & Montminy, M. R. (1988). Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature*, 334, 494-498.
- Yang, C.-C., Hsu, C.-P. & Yang, S.-D. (2000). Antisense suppression of proline-directed protein kinase FA enhances chemosensitivity in human prostate cancer cells. *Clin.Cancer Res.*, 6, 1024-1030.
- Yang, E. J., Ahn, Y. S. & Chung, K. C. (2001). Protein kinase Dyrk1 activates cAMP response element-binding protein during neuronal differentiation in hippocampal progenitor cells. *J.Biol.Chem.*, 276, 39819-39824.
- Zou, Y., Ewton, D. Z., Deng, X., Mercer, S. E. & Friedman, E. (2004). Mirk/dyrk1B kinase destabilizes cyclin D1 by phosphorylation at threonine 288. *J.Biol.Chem.*, 279, 27790-27798.

7. Anhang

7.1 Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
A. bidest.	Aqua bidestillata
Acc	<i>accession number</i>
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	<i>A(denine)/U(ridine)-Rich Element</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	<i>CREB-Binding Protein</i>
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i>
cDNA	copy-DNA bzw. komplementäre DNA
cfu	<i>colony forming units</i>
Ci	Curie
CK2	<i>Casein Kinase 2</i>
CLK	<i>CDC (Cell Division Cycle)-Like Kinase</i>
COS	<i>CV1 Origin SV40</i>
CRE	<i>cAMP Response Element</i>
CREB	<i>cAMP Response Element Binding Protein</i>
P-CREB	Phospho-CREB (phosphoryliertes CREB)
cpm	<i>counts per minute</i>
d	Tag(e)
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat

DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSCR	<i>Down Syndrome Critical Region</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	D,L-Dithiothreitol
DYRK	<i>Dual-Specificity Tyrosine (Y) Phosphorylation-Regulated Kinase</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
ECS	Electro Coupling Solution
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis(β -Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ERK	<i>Extracellular Signal Regulated Kinase</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
FCS	<i>Foetal Calf Serum</i> (Fötales Kälberserum)
FKHR	<i>Forkhead in Rhabdomyosarcoma</i>
for	<i>forward</i>
g	Gramm bzw. Zentrifugalbeschleunigung
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3'-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GSK	Glykogensynthasekinase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
kb	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
l	Liter

LB	Nährmedium nach Luria/Bertani
LSB	<i>Laemmli Sample Buffer</i>
Luc/luc	Luciferase
M	molar [mol/l] bzw. Methionin
mA	Milliampère
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
Mb	Megabasen(paare)
MEK	MAP-Kinase-Kinase
min	Minute(n)
MKK	MAP-Kinase-Kinase
MNB	minibrain (DYRK1A-Ortholog in <i>Drosophila melanogaster</i>)
<i>MNBH</i>	<i>minibrain human (DYRK1A)</i>
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
n	Anzahl unabhängiger Versuche bzw. unbestimmte Anzahl an Basenpaaren im Poly-A-Schwanz
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T Cells</i>
NLS	<i>Nuclear Localisation Signal</i>
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet-P40
OD	Optische Dichte
p53	Tumorprotein p53 (s. TP53)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
POD	Peroxidase
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
Rb	Retinoblastom-Protein
rev	<i>reverse</i>

RLU	<i>Relative Luciferase Units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rotations per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RZPD	Ressourcenzentrum - Primäre Datenbank
s	Sekunde(n)
SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
Ser	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris Buffered Saline with Tween[®] 20 R NF</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TP53	Tumorprotein 53 (p53)
TS	Transkriptionsstart
u	<i>unit(s)</i>
U	Uracil
ÜN	über Nacht
ÜT	über Tag
UTR	<i>Untranslated Region</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen/Volumen)
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht/Volumen)
Y	Tyrosin

7.2 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Proteinkinase DYRK1A in Säugetieren.....	6
Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Proteinkinase DYRK1B in Säugetieren.....	8
Abb. 2.1: Schema von pWZL-neo-DYRK1B-p65	26
Abb. 2.2: Schema von pWZL-neo-DYRK1B-p69	26
Abb. 2.3: Schema von pWZL-neo-DYRK1B-p75	27
Abb. 2.4: Schemata des pGL3-Basic-Reportergenvektors mit <i>DYRK1A</i> -Promotor- <i>Insert</i> und der in pGL3-Basic klonierten <i>DYRK1A</i> -Sequenzen	28
Abb. 2.5: Schema von pGL3-hDYRK1A-Exon1G	32
Abb. 2.6: Schemata von pGL3-hDYRK1A-A und pGL3-hDYRK1A-B.....	32
Abb. 2.7: Schema eines EMSAs am Beispiel von CREB	46
Abb. 2.8: Schema der RNA-Interferenz	54
Abb. 3.1: Promotorregion des humanen <i>DYRK1A</i> -Gens.....	63-64
Abb. 3.2: Schema der Herstellung einer CAGE-Bibliothek	65
Abb. 3.3: CAGE- <i>Tag</i> -Verteilung innerhalb der 900 bp <i>upstream</i> von TS B im <i>DYRK1A</i> -Gen	66
Abb. 3.4: <i>DYRK1A</i> -Regulation durch zwei Promotoren A und B in SAOS-2-Zellen .	68
Abb. 3.5: Höhere Aktivität von Promotor A im Vergleich zu Promotor B in..... SAOS-2-Zellen.....	69
Abb. 3.6: Erhöhte Aktivitäten der <i>DYRK1A</i> -Promotoren A und B in SAOS-2- Zellen bei Serumentzug.....	70
Abb. 3.7: Erhöhte Aktivität von <i>DYRK1A</i> -Promotor B bei Serumarmut bzw. Serumentzug	71
Abb. 3.8: Schema des „ <i>Cancer Profiling Arrays I</i> “ (oben bzw. s. Text) und Regulation der <i>DYRK1A</i> -mRNA in humanen Tumorzellen bzw. Tumor- zelllinien (unten rechts) diverser Gewebe auf diesem <i>Array</i> (unten).....	73
Abb. 3.9: Strukturformel des 5-Fluorouracils (5-FU)	75
Abb. 3.10: Schema des „ <i>Cancer Cell Line Profiling Arrays</i> “ (oben bzw. s. Text) und Regulation der <i>DYRK1A</i> -mRNA in humanen Tumorzelllinien diverser Gewebe auf diesem <i>Array</i> (unten)	76
Abb. 3.11: Hochregulation der <i>DYRK1A</i> - und der Dihydrofolatreduktase (<i>DHFR</i>)- Expression durch dreitägige Behandlung von PC-3- bzw. Phoenix TM - Zellen mit 5-FU	77

Abb. 3.12: Hochregulation der <i>DYRK1A</i> - und der Dihydrofolatreduktase (<i>DHFR</i>)- Expression durch ein-, zwei- bzw. dreitägige Behandlung von PC-3- Zellen mit 5-FU	78
Abb. 3.13: Hochregulation der <i>DYRK1A</i> - und der Dihydrofolatreduktase (<i>DHFR</i>)- Expression durch ein-, zwei- bzw. dreitägige Behandlung von Phoenix TM -Zellen mit 5-FU.....	79
Abb. 3.14: Mikroskopische Durchlichtaufnahmen von unterschiedlich lang mit 5-FU [90 µM] bzw. Kontrolle (DMSO) behandelten PC-3- bzw. Phoenix TM - Zellen.....	80
Abb. 3.15: Kein Einfluss von 5-FU auf die Aktivitäten der Promotoren A und B in PC-3-Zellen.....	81
Abb. 3.16: Kein Anstieg der <i>DYRK1A</i> -Proteinmenge durch 5-FU [100 µM]- Behandlung von PC-3- bzw. Phoenix TM -Zellen	82
Abb. 3.17: <i>DYRK1A</i> - und Phospho-Rb-Protein nach 5-FU [100 µM]-Behandlung von Phoenix TM -Zellen.....	83
Abb. 3.18: Verminderte Aktivitäten der <i>DYRK1A</i> -Promotoren A und B in <i>TP53</i> überexprimierenden PC-3-Zellen.....	85
Abb. 3.19: Kein Anstieg der <i>DYRK1A</i> -Proteinmenge bei reduzierter <i>TP53</i> - Expression in HeLa-Zellen.....	86
Abb. 3.20: Strukturformeln von Aphidicolin (A), Nocodazol (B) und Lovastatin (C) ..	87
Abb. 3.21: Regulation der <i>DYRK1A</i> -Expression in PC-3-Zellen durch Nocodazol, Aphidicolin bzw. Lovastatin.....	88
Abb. 3.22: Schema des Tet-On-Systems für E2F1 in SAOS-2-Zellen.....	90
Abb. 3.23: WST-Assay zur Überprüfung der Toxizität von Doxycyclin in SAOS-2- Zellen.....	91
Abb. 3.24: Hochregulation der <i>DYRK1A</i> - und der Dihydrofolatreduktase (<i>DHFR</i>)- Expression durch den überexprimierten Transkriptionsfaktor E2F1 in SAOS-2- bzw. Phoenix TM -Zellen.....	92
Abb. 3.25: Stimulation der Aktivität des 418 bp langen 5'-Deletionsfragmentes des <i>DYRK1A</i> -Promotors B durch Doxycyclin-induziertes E2F1 in SAOS-2-Zellen.....	93
Abb. 3.26: Aktivierung des <i>DYRK1A</i> -Promotors B und eines seiner 5'-Deletions- fragmente durch Doxycyclin-induziertes E2F1 in SAOS-2-Zellen.....	94
Abb. 3.27: Aktivierung des <i>DYRK1A</i> -Promotors B und dessen 5'-Deletions-	

fragmenten durch Doxycyclin-induziertes E2F1 in SAOS-2-Zellen.....	95
Abb. 3.28: Kein Anstieg der DYRK1A-Proteinmenge durch überexprimiertes E2F1 in Phoenix TM -Zellen	96
Abb. 3.29: cAMP-induzierte Phosphorylierung von CREB in PC-12-Zellen.....	97
Abb. 3.30: (P-)CREB/ <i>DYRK1A</i> -Promotor A-Bindung in PC-12-Zellen (Normal- medium).....	99
Abb. 3.31: (P-)CREB/ <i>DYRK1A</i> -Promotor A-Bindung in PC-12-Zellen (Serum- entzug).....	100
Abb. 3.32: Kein Effekt von P-CREB auf die Aktivitäten der Promotoren A und B in PC-12-Zellen.....	101
Abb. 3.33: Kein Effekt von P-CREB auf die Aktivitäten der Promotoren A und B in PC-3-Zellen.....	102
Abb. 3.34: 3'-Nukleotidsequenz der humanen <i>DYRK1A</i> -cDNA mit der GenBank [®] -Nr. NM_101395	104
Abb. 3.35: Stabilität der <i>DYRK1A</i> -mRNA in PC-3-Zellen	105
Abb. 3.36: Stabilität der <i>GFP-DYRK1A</i> -mRNA ohne AU-reiche Elemente in in PC-3-Zellen.....	106
Abb. 3.37: Stabilität der <i>DYRK1A</i> -mRNAs in NIH-3T3-Zellen	107
Abb. 3.38: DYRK1B-Spleißvarianten in adhärenen Zelllinien.....	108
Abb. 3.39: Unterschiedlich starke Stimulation der FKHR-abhängigen Glukose-6- Phosphatase-Promotoraktivität durch DYRK1B-Spleißvarianten in COS-7-Zellen	109
Abb. 3.40: Überexprimierte DYRK1B-Spleißvarianten in Phoenix TM - bzw. NIH-3T3-Zellen	110
Abb. 3.41: DYRK1B-Spleißvarianten in den Zelllinien INS-1 und NIH-3T3	111
Abb. 3.42: Erhöhte DYRK1A- und DYRK1B-p69-Mengen in NIH-3T3-Zellen bei Serumentzug.....	113
Abb. 3.43: Lebensfähigkeit von NIH-3T3-Zellen mit endogener bzw. exogener DYRK1B-p69 in Normalmedium bzw. bei Serumentzug.....	115
Abb. 3.44: Alternatives Spleißen der 5'-Region der <i>DYRK1A</i> -Prä-mRNA.....	117

7.3 Verzeichnis der Tabellen

Tab.2.1: Oligonukleotide zur Klonierung und Sequenzierung der <i>DYRK1A</i> -Promotorkonstrukte	29
Tab. 2.2: PCR-Bedingungen zur Klonierung der drei mutmaßlichen Promotoren des humanen <i>DYRK1A</i> -Gens	31
Tab. 2.3: Sequenzierungen von pGL3-hDYRK1A-Exon1G und dessen Vorstufe.....	33
Tab. 2.4: Sequenzierungen von pGL3-hDYRK1A-A, -B, der Konstrukte mit beiden Transkriptionsstarts sowie der 5´-Deletionskonstrukte von <i>DYRK1A</i> -Promotor B	34
Tab. 2.5: Übersicht der kultivierten adhärenenten Zelllinien.....	35
Tab. 2.6: Übersicht der verwendeten Zellkulturmedien (Normalmedien)	36
Tab. 2.7: Liste der in EMSAs genutzten Oligonukleotide.....	44
Tab. 2.8: Liste der Antikörper für <i>Western blot</i> -Hybridisierungen	57

Danke!

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Walter Becker (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, RWTH Aachen, wo ich diese Arbeit anfertigen durfte) und Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr (Pharmakologie und Toxikologie, Pharmazeutisches Institut, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) für die ausgezeichnete Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Walter Becker danke ich für das sehr interessante Thema und die Chance, mit Hilfe eines breiten Methodenspektrums der Molekular- und Zellbiologie selbstständig zu forschen. Auch für seine Anregungen, seine allzeitige Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen Gelegenheiten, meine Ergebnisse in deutscher und englischer Sprache am Institut und auf Tagungen präsentieren zu dürfen, danke ich ihm.

Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr bin ich für sein Interesse an meiner Arbeit und für wertvolle Denkanstöße dankbar.

Ein herzliches Dankeschön an alle Mitarbeiter des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der RWTH Aachen für das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung. Meine Anerkennung gilt insbesondere Frau Hanna Czajkowska für die Durchführung der RACE-PCR und zahlreiche wertvolle Tipps im Labor, Frau Ana-Lena Reiners, die als Forschungspraktikantin mit mir erfolgreich bei der Klonierung von Promotorfragmenten kooperierte, Frau Katrin de Graaf für die Einführung in die Klonierung, Frau Steffi Korfmacher für Spaß im Labor und Herrn Dr. Paul Hekerman für sein Interesse an meiner Arbeit, deren kritische Durchsicht, die Einführung in Zellkultur, *Northern blot* und EMSA sowie für Ratschläge, Diskussionen und Motivation („Mach´ Dir keine Sorgen!“). Für seine Geduld und sein Verständnis danke ich ihm sehr.

Außerdem möchte ich Herrn Klaus-Dieter Krüger für die Bereitstellung von Literatur und einer großen Elektrophoresekammer samt Zubehör, Herrn Benedikt Pilatus für die kompetente Einweisung am Fluoreszenzmikroskop, Herrn Holger Knobelspies für die Hilfe am Computer, Herrn Prof. Dr. Joachim Greven für den Aktin-Antikörper und Herrn Pierre Pirot (Université Libre de Bruxelles) für die Hilfe bei der statistischen Auswertung danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde (Klinische Pharmazie, Pharmazeutisches Institut, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) und Herrn Prof. Dr. Fred Schaper (Institut für Biochemie, RWTH Aachen) als Mitgliedern der Promotionskommission, den Damen und Herren des Promotionsausschusses und Frau Helga Franz vom Promotionsbüro des Dekanates der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Meinen Eltern danke ich von Herzen dafür, dass sie mich stets interessiert und einfühlsam motivieren, großes Vertrauen in mich setzen und mich jederzeit unterstützen.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

I Originalarbeit

Leder, S., Czajkowska, H., Maenz, B., de Graaf, K., Barthel, A., Joost, H.-G., Becker W. (2003). Alternative splicing variants of dual specificity tyrosine phosphorylated and regulated kinase 1B exhibit distinct patterns of expression and functional properties. *Biochem. J.*, 372, 881-888.

II Als Abstracts publizierte Kongressbeiträge

Maenz, B., Reiners, A.-L., Hekerman, P., Becker, W. (2005). Transcriptional regulation of the protein kinase DYRK1A by the transcription factor E2F1. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 371 (Suppl. 1), R53, Abstract 223. (Poster beim 46th Spring Meeting, Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 17.03.2005)

Maenz, B., Czajkowska, H., Becker, W. (2006). The human protein kinase DYRK1A: two alternative promoters control the transcription of the human DYRK1A gene. *Signal Transduction*, 5, Issue S1, p S37. (Kurzvortrag und Poster beim 9th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS), Weimar, 10.11.-11.11.2005)

Maenz, B., Czajkowska, H., Becker, W. (2006). Transcriptional regulation of the human *DYRK1A* gene. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 372 (Suppl. 1), S. 58, Abstract 194. (Vortrag beim 47th Spring Meeting, Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 06.04.2006)

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Barbara Maria Magdalena Mänz
Geburtsdatum: 27. Mai 1977
Geburtsort: Saarbrücken
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schul Ausbildung:

September 1983 - Juli 1987 Grundschole Stefanschule, Schmelz/Saar
September 1987 - Juni 1996 Realgymnasium Völklingen
Sommer 1995 Deutsche SchülerAkademie, Kurs „Nature or nurture-
Angeboren oder erworben?“, Braunschweig
Juni 1996 Abitur

Hochschulausbildung:

Oktober 1996 - März 1997 Studium der Romanistik (Französisch und Spanisch),
Universität des Saarlandes, Saarbrücken
April 1997 - April 2001 Studium der Pharmazie, Universität des Saarlandes,
Saarbrücken
September 1997 und März 1998 Famulatur in der Central-Apotheke, Saarbrücken
März 1999 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
April 2001 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Mai 2001 - Oktober 2001 Pharmaziepraktikum in der Central-Apotheke,
Saarbrücken
November 2001 - April 2002 Pharmaziepraktikum bei der Bayer AG, Wuppertal-
Elberfeld, Herz-Kreislauf-Forschung II
Juni 2002 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Juli 2002 Approbation als Apothekerin
August 2002 - September 2006 Dissertation (Institut für Pharmakologie und Toxikolo-
gie, RWTH Aachen; Betreuer: Herr Prof. Dr. Walter
Becker, Aachen, und Herr Prof. Dr. Klaus Mohr, Bonn)
März 2007 Promotion (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn)